
R.C.P. EDINBURGH LIBRARY
R28116W0236

TRAITÉ

DE

TECHNIQUE MICROBIOLOGIQUE

A L'USAGE DES MÉDECINS ET DES VÉTÉRINAIRES

PAR LES DOCTEURS

M. NICOLLE

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

ET

P. REMLINGER

Directeur de l'Institut impérial de bactériologie de Constantinople

Médecin-Major hors cadres

Avec une Préface du Dr Roux

Membre de l'Institut, Sous-Directeur de l'Institut Pasteur

AVEC 211 FIGURES DANS LE TEXTE

PARIS

OCTAVE DOIN, ÉDITEUR

8, PLACE DE L'ODÉON, 8

1902

PRÉFACE

Ce livre est écrit par des hommes de laboratoire; dès le premier chapitre le lecteur en sera convaincu.

C'est un traité de technique bactériologique; par conséquent il ne faut pas y chercher des théories, mais bien des méthodes et des documents pratiques. Il s'adresse surtout aux médecins et aux vétérinaires; cependant tous ceux qui ont besoin de connaissances bactériologiques, chimistes, industriels, agriculteurs, le liront avec profit.

L'ouvrage se divise en deux parties: la technique générale et la technique spéciale.

La technique générale débute par un chapitre sur l'installation du laboratoire, où l'expérience personnelle des auteurs apparaît dans chaque détail; ils y montrent comment, sans dépenses exagérées, on peut agencer un laboratoire suffisant à tous les besoins. Bien des points, dont on parle à peine d'ordinaire, sont traités avec beaucoup de soin, telles les inoculations expérimentales, les moyens de vaincre la résistance des animaux, les maladies des animaux de laboratoire, etc. Tous ces renseignements épargneront bien des déboires aux travailleurs. Pour ce qui est des procédés de culture et de coloration, les

auteurs se gardent bien d'écraser leurs lecteurs sous le nombre ; ils indiquent ceux qu'ils estiment les meilleurs, et que d'ailleurs ils ont souvent modifiés, d'après leur propre expérience, de la façon la plus heureuse.

Dans la technique spéciale, les chapitres sur les actions diastasiques, les toxines microbiennes, les modifications de la virulence, les vaccinations, renferment un grand nombre de données, éparses dans les mémoires des différents auteurs ; ainsi rassemblées, elles s'éclairent les unes par les autres et inciteront les travailleurs à des expériences nouvelles.

Des chapitres d'une rédaction tout à fait originale sont ceux qui se rapportent aux leucocytes et à leurs propriétés. Après cette étude des leucocytes, celle des substances qu'ils élaborent vient tout naturellement ; les pages consacrées aux substances bactéricides, agglutinantes, aux sensibilisatrices et aux antitoxines résument ce qui a été fait dans ces dernières années et indiquent les conséquences pratiques qui en découlent.

La marche suivie dans l'exposé des microbes pathogènes est très méthodique et permet à chacun de reconnaître et de caractériser sûrement chaque espèce. Tout ce que l'on sait sur les derniers venus dans la bactériologie, sur les microbes invisibles, est résumé d'une façon fort intéressante. Ces infiniment petits qu'on ne voit pas au microscope et qui traversent les filtres, causent la péripneumonie bovine, la fièvre aphteuse, la peste bovine, la clavelée, etc. Les étudiants ne peuvent plus les ignorer.

Un semblable livre n'était pas facile à faire ; les auteurs en ont heureusement surmonté les difficultés.

Leur ouvrage se distingue par les qualités que l'on trouve à un si haut point dans les Éléments de Microbiologie Générale, publiés par M. Nicolle en 1901, à savoir : l'originalité du plan et du style et la sûreté de la documentation. Il mérite le même succès et il y a plaisir à le recommander au public.

D[r] Roux.

TABLE DES MATIÈRES

TECHNIQUE GÉNÉRALE

		Pages.
Chapitre I.	Installation d'un laboratoire de bactériologie..	1
Chapitre II.	Le microscope.	38
Chapitre III.	Procédés de stérilisation.	53
Chapitre IV.	Vases de culture. Milieux de culture en général. Milieux liquides.	85
Chapitre V.	Milieux solides.	117
Chapitre VI.	Milieux à base de sérum.	138
Chapitre VII.	Ensemencements. Mise en culture. Conservation des semences. Réglage des étuves.	154
Chapitre VIII.	Séparation et isolement des microbes aérobies.	168
Chapitre IX.	Culture et séparation des microbes anaérobies.	180
Chapitre X.	Élevage et nourriture des animaux. Maladies des animaux de laboratoire.	204
Chapitre XI.	Inoculations expérimentales. Prélèvement des produits in vivo.	219
Chapitre XII.	Autopsies humaines et animales. Prélèvement des produits sur le cadavre.	270
Chapitre XIII.	Préparation des coupes..	281
Chapitre XIV.	Examen à l'état frais sans coloration.	292
Chapitre XV.	Matières colorantes.	301
Chapitre XVI.	Coloration sur lames.	308
Chapitre XVII.	Coloration des coupes.	321
Chapitre XVIII.	Colorations spéciales (spores, capsules, cils, etc.).	326

TECHNIQUE SPÉCIALE

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE PRATIQUE DES PRINCIPALES FONCTIONS MICROBIENNES

CHAPITRE I. Nutrition des microbes. 342
CHAPITRE II Production de matières colorantes et de lumière. 361
CHAPITRE III. Action des diverses causes nuisibles sur les microbes, etc. 366
CHAPITRE IV. Poisons microbiens. 380
CHAPITRE V. Modifications de la virulence. Préparation des divers vaccins.. 399

SECONDE PARTIE

ÉTUDE PRATIQUE DES LEUCOCYTES, DE L'IMMUNITÉ, ETC.

CHAPITRE I. Morphologie et numération des leucocytes.. 412
CHAPITRE II. Mobilité, sensibilités, migrations des leucocytes. 424
CHAPITRE III. Substances bactéricides et agglutinantes des sérums normaux. Phagocytose. . 433
CHAPITRE IV. Immunité. Préparation des divers sérums thérapeutiques.. 443
CHAPITRE V. Étude des cytotoxines. 481

TROISIÈME PARTIE

APPLICATIONS MÉDICALES ET VÉTÉRINAIRES

Maladies communes à l'homme et aux animaux.

Charbon. 497
Affections dues au vibrion septique. 507
Tétanos. 514
Morve. 522
Tuberculose. 531
Verruga.. 552

Pseudo-tuberculose en général. Pseudo-tuberculose cocco-bacillaire. 554
Psittacose. 560
Généralités sur les streptothrix. Actinomycose. . . 563
Botryomycose. 570
Pseudo-tuberculose aspergillaire (aspergillose). . . 575
Favus 580
Vaccine. Variole. 583
Rage.. 590

Maladies propres à l'homme.

Fièvre typhoïde. 595
Affections dues aux colibacilles. 614
Diphtérie. 624
Affections dues au pneumocoque. 638
Affections dues aux bacilles encapsulés. 645
Affections dues aux staphylocoques. 653
Affections dues aux streptocoques. 659
Affections dues aux tétragènes. 668
Affections dues au b. pyocyanique. Bacilles verts fluorescents. 671
Choléra. 678
Peste. 689
Lèpre. 701
Blennorrhagie. 707
Chancre mou. 712
Influenza (bacille de Pfeiffer). 715
Méningite cérébro-spinale épidémique. 722
Fièvre de Malte. 727
Conjonctivite diplo-bacillaire chronique. 731
Conjonctivite aiguë contagieuse. 733
Pourriture d'hôpital. 735
Angine de Vincent. 739
Fièvre jaune. 744
Fièvre récurrente. 751
Gangrènes et suppurations dues aux anaérobies de Veillon. 755
Affections dues aux streptothrix. 765
Affections dues aux blastomycètes. 771
Muguet. 774
Teignes tondantes de l'homme.. 778
Pityriasis versicolor. 788
Aspergilloses cutanées. 789
Paludisme. 790

Maladies propres aux animaux.

Pasteurelloses. Hog choléra. 799
Rouget du porc. 812
Charbon symptomatique. Bradsot. 817
Affections dues aux colibacilles. 826
Affections dues aux streptocoques. 829
Mammite gangreneuse des brebis laitières. . . . 834
Affections dues au bacille de Vreisz-Nocard. . . . 835
Septicémie vibrionnienne. 840
Spirillose des oies. 841
Farcin du bœuf. 843
Péripneumonie. 846
Fièvre aphteuse. 857
Horse-Sickness. 862
Peste bovine. 865
Clavelée. 876
Teignes des animaux. 882
Affections dues aux blastomycètes. 884
Affections dues aux hématozoaires endoglobulaires. . 887
Affections causées par les trypanosomes. 896

QUATRIÈME PARTIE

APPLICATIONS HYGIÉNIQUES

CHAPITRE I. Étude bactériologique des eaux. . . . 906
CHAPITRE II. Étude bactériologique de l'air. 935
CHAPITRE III. Étude bactériologique du sol. 951
CHAPITRE IV. Étude bactériologique des aliments. . . 963
CHAPITRE V. Étude bactériologique du lait, du beurre et des fromages. 972

FORMULAIRE. 987

ADDENDA. 995

TRAITÉ

DE

TECHNIQUE MICROBIOLOGIQUE

TECHNIQUE GÉNÉRALE

CHAPITRE I

INSTALLATION D'UN LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE

I. *Disposition générale.*

Les laboratoires de bactériologie sont loin d'être conçus d'après un type uniforme. Entre les Instituts Pasteur monumentaux qu'on rencontre dans quelques grandes villes et les modestes cabinets d'analyse annexés à la plupart des services de clinique, on trouve tous les intermédiaires. Nous prendrons pour type de notre description un terme moyen. Nous aurons en vue un laboratoire possédant le matériel indispensable à l'étude des principales maladies infectieuses, capable de faire face aux demandes d'expertises publiques ou privées, en mesure de servir également aux recherches originales du directeur et de ses aides. Ces trois conditions se trouvent remplies par les laboratoires qui servent à la préparation du cours de bactériologie dans les écoles médicales ou vétérinaires.

Ainsi compris, le laboratoire de bactériologie est bien différent du laboratoire d'anatomie pathologique, auquel une pièce quelconque peut suffire et dont le

matériel tiendrait au besoin sur une seule table. Des locaux relativement vastes lui sont nécessaires. Il est très utile qu'ils soient situés au rez-de-chaussée, de plain-pied avec la pièce réservée aux animaux. Il est à désirer également qu'ils constituent un pavillon isolé, bien séparé du reste des habitations.

L'installation d'un laboratoire de bactériologie doit prévoir :

1° Une salle de travail, vaste pièce où se trouveront les microscopes et les principaux appareils. C'est le laboratoire proprement dit.

2° Une chambre spéciale pour les étuves.

3° Un cabinet de rédaction et de réception des étrangers.

4° Une chambre servant de dépôt pour le matériel et les produits chimiques.

5° Un local pour les animaux.

1° LABORATOIRE PROPREMENT DIT

C'est la pièce la plus importante. Elle doit à elle seule être presque aussi spacieuse que toutes les autres réunies. Il y a quelque avantage à lui donner une forme rectangulaire et à l'éclairer d'un seul côté à l'aide d'une longue baie vitrée. Parallèlement à cette baie, on disposera une table recouverte d'opaline ou de lave émaillée, dont la hauteur sera calculée de façon que le travail au microscope puisse s'effectuer assis sans aucune difficulté. L'opaline est plus économique que la lave émaillée, mais elle est aussi plus froide et les ballons remplis de liquides un peu chauds cassent facilement à son contact. On pourra se contenter au besoin d'une table de bois recouverte de toile cirée. Sur la table, chacune des personnes qui travaillent au laboratoire a sa place marquée par son microscope et ses réactifs. Elle a, à portée

de sa main, un bec de Bunsen à flamme éclairante et chauffante, une lampe pour le travail du soir et un poste d'eau.

Sur l'autre grand côté de la salle, une hotte recouverte d'un carrelage supporte les autoclaves, les balances (à l'exception de la balance de précision), le four Pasteur et des réchauds à gaz sur lesquels on fera bouillir notamment les instruments placés dans des boîtes en tôle émaillée. On pourra également disposer quelques-unes des étuves sous cette hotte, dans la partie de la salle la moins exposée aux courants d'air. Mais il est préférable de leur consacrer une chambre séparée. Une table spéciale pour les autopsies; plusieurs armoires en bois pour les milieux nutritifs et objets usuels; quelques étagères pour la verrerie; un évier, au-dessus duquel sera placée la trompe à eau; une soufflerie, et d'autres appareils dont l'énumération va suivre, compléteront l'ameublement, assez simple comme on voit. Notons que les armoires des laboratoires ne doivent pas laisser pénétrer la lumière; elles seront tout en bois, ou bien on collera du papier noir sur les parties vitrées. Le chauffage de la pièce sera assuré par un poêle à anthracite, du système Besson par exemple. Lorsqu'on dispose de l'électricité, on l'emploiera à la fois pour le chauffage des étuves, pour l'éclairage et comme source de force motrice. Il va de soi que les conduites d'eau et de gaz doivent être

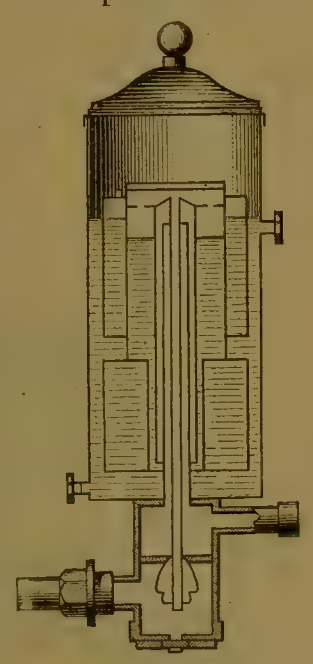


Fig. 1. — Régulateur Giroud.

soigneusement protégées contre la gelée. Chaque robinet d'eau sera muni d'un coupe-pression. Il arrive fréquemment que la pression du gaz subisse d'un moment à l'autre de la journée de notables variations ; on y obviera à l'aide d'un régulateur Giroud (fig. 1)

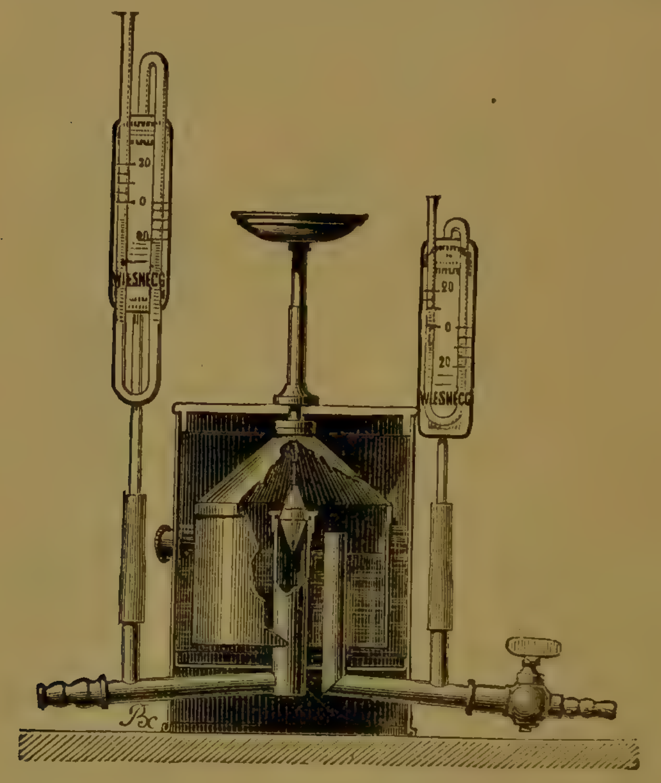


Fig. 2. — Régulateur Moitessier.

appliqué à toute la canalisation ou à l'aide d'un régulateur Moitessier (fig. 2) commandant les étuves.

2° CHAMBRE SPÉCIALE POUR LES ÉTUVES

Quelque perfectionnés que soient les régulateurs dont sont munies les étuves, celles-ci demeurent très

sensibles aux influences atmosphériques et aux courants d'air, tels que ceux qui résultent de l'ouverture des portes et des fenêtres. De plus, les allées et venues peuvent éteindre les brûleurs. Il est donc bon de placer les étuves dans une chambre spéciale, où on ne pénétrera que le moins souvent possible. La porte sera munie d'un tambour intérieur, qui diminuera l'entrée de l'air lors de chaque ouverture; la fenêtre sera garnie de coussinets. Les allées et venues étant évitées autant que possible, les poussières atmosphériques se trouveront réduites au minimum. La pièce pourra ainsi être utilisée pour les opérations ou analyses où la contamination par les microbes de l'air est plus particulièrement à craindre. Les pesées à la balance de précision gagneront également à y être pratiquées. Une table recouverte, comme les autres, de lave émaillée, d'opaline ou de toile cirée servira à cette double fin.

3° CABINET DE RÉDACTION

La nécessité d'un cabinet de rédaction, indépendant du laboratoire proprement dit, n'est pas à démontrer. Là se trouveront les archives du laboratoire, et la bibliothèque comprenant livres et périodiques. Cette même pièce pourra servir de salle de réception et d'attente pour les visiteurs, dont la présence trop fréquente dans le laboratoire serait préjudiciable au travail.

4° CHAMBRE SERVANT DE DÉPOT

Le laboratoire ne doit pas être encombré par la verrerie, par les réactifs, par les produits chimiques, par des appareils dont on ne se sert qu'exceptionnellement. Il y aura profit à disposer tous ces objets dans

une salle spéciale, en bon ordre et à l'abri de l'humidité.

D'une façon générale, un laboratoire de bactériologie doit être compris comme une salle d'opération. Le sol sera dallé ou recouvert de céramique, les parois revêtues de stuc, les angles des murs et des plafonds arrondis. Les meubles ordinaires, tapis, rideaux, tentures, en un mot tout ce qui pourrait servir de réceptacle aux poussières, sera banni avec le plus grand soin. On assurera exclusivement le nettoyage par le passage de torchons humides. Le balayage à sec sera rigoureusement proscrit.

5° LOCAL POUR LES ANIMAUX

Les animaux occuperont un petit pavillon séparé du reste du laboratoire. Ce pavillon devra être assez spacieux, bien aéré, muni d'un poêle pour l'hiver. Il comprendra deux pièces, l'une destinée aux animaux sains (on pourra y faire un peu d'élevage), l'autre réservée aux animaux inoculés. Une troisième salle serait très utile pour permettre de faire subir une quarantaine aux animaux lors de leur arrivée au laboratoire. Tout autour de chacune des pièces indiquées seront disposées, sur une seule hauteur, des cages métalliques mobiles, de préférence en fer galvanisé, faciles à laver à la lance et à désinfecter par le flambage. Ces cages porteront un double fond, afin de faciliter le nettoyage. Chaque matin, le sol dallé, et au besoin les cages elles-mêmes, doivent être lavées à grande eau au moyen de la lance. Chaque fois qu'un animal vient à succomber, les cages seront flambées, ou trempées dans une solution de crésyl ou d'acide carbolique. A cet effet, le local des animaux doit être pourvu d'une cuve, qui servira égale-

ment pour le lavage de la verrerie. Les cadavres pourront être brûlés dans le poêle de la salle des animaux.

II. *Appareils et produits chimiques nécessaires.*

Nous les diviserons en sept groupes un peu artificiels : appareils servant à la stérilisation et à la filtration — appareils servant aux cultures — appareils servant à l'étude microscopique — appareils servant aux inoculations, à la préparation des sérums, etc. — verrerie — produits chimiques.

A. Appareils servant a la stérilisation et a la filtration

1° **Fours à flamber.** — Le four à flamber sert à la stérilisation de la verrerie par la chaleur sèche. Cylindrique (four Pasteur) ou parallélipipédique (four Chantemesse) il est constitué par une boîte de tôle à double paroi, au-dessous de laquelle est placé un brûleur à gaz. La paroi interne limite une cavité dans laquelle seront disposés les objets à stériliser. Il existe des fours à flamber de dimensions très diverses. Nous conseillons les modèles suivants :

Four Pasteur (dimensions intérieures) hauteur : $0^{m},43$ — diamètre : $0^{m},24$; ou encore le modèle plus grand : hauteur : $0^{m},45$ — diamètre : $0^{m},42$.

Four Chantemesse (dimensions intérieures) : hauteur : $0^{m},35$ — largeur : $0^{m},22$ — profondeur : $0^{m},20$.

2° **Autoclaves.** — L'autoclave Chamberland trouve son indication principale dans la préparation des milieux nutritifs. Ce n'est autre chose qu'une marmite

de Papin dont le couvercle porte un robinet, une soupape, un manomètre, et se fixe à l'aide d'écrous. Il en existe différentes grandeurs. Comme la stérilisation est d'autant plus longue à effectuer que les dimensions de l'autoclave sont plus considérables, il

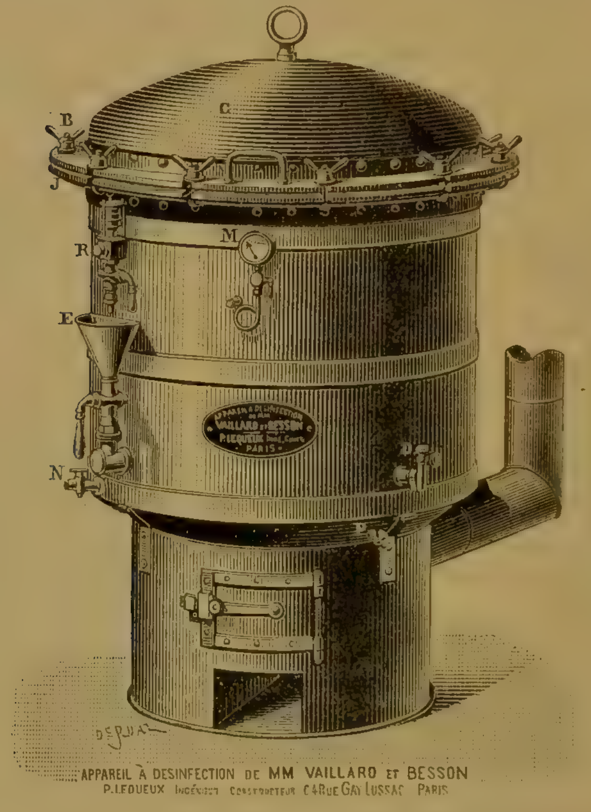


Fig. 3. — Étuve à désinfection de MM. Vaillard et Besson.

est bon de pouvoir disposer de plusieurs modèles : les plus grands destinés aux stérilisations habituelles (que l'on a intérêt à pratiquer en même temps sur le plus d'objets possible), les plus petits réservés aux cas urgents (lorsqu'on n'a à stériliser que quelques objets peu volumineux). Les dimensions intérieures

des autoclaves courants de la maison Wiesnegg (que nous citons comme exemples) sont les suivantes :

	HAUTEUR	DIAMÈTRE
	—	—
Petit modèle. . . .	0,26	0,20
Modèle moyen. . . .	0,37	0,26
Grand modèle. . . .	0,53	0,34

Dans les laboratoires un peu importants il est indispensable de posséder un appareil Vaillard et Besson (fig. 3, modèle vertical) qui permettra de faire des stérilisations en grand (bocaux, vases à sérum, etc.).

3° **Stérilisateurs.** — En plus des autoclaves, on doit avoir un stérilisateur utilisant la vapeur d'eau à 100°, celui de Wiesnegg par exemple (hauteur : 30 centimètres — diamètre : 20 centimètres) ou encore l'appareil Budenberg. On réalisera ainsi, pour certaines stérilisations, une économie notable de temps et de gaz.

4° **Appareils servant à la filtration** :

*Bougies Chamberland (B et F), bougies Berkefeld.

*Matras filtreur de Chamberland.

Appareil à filtrer l'eau de conduite, de Chamberland.

Appareil Martin.

Appareil de Chamberland, pour filtrer par pression.

*Caoutchouc Martin.

*Poire de Richardson. Petite pompe à main.

Four à moufle, pour régénérer les bougies Chamberland.

B. Appareils servant aux cultures

1° **Étuves.** — Les étuves sont destinées à maintenir les cultures microbiennes à une température favorable. Il est nécessaire de posséder des étuves à air et des

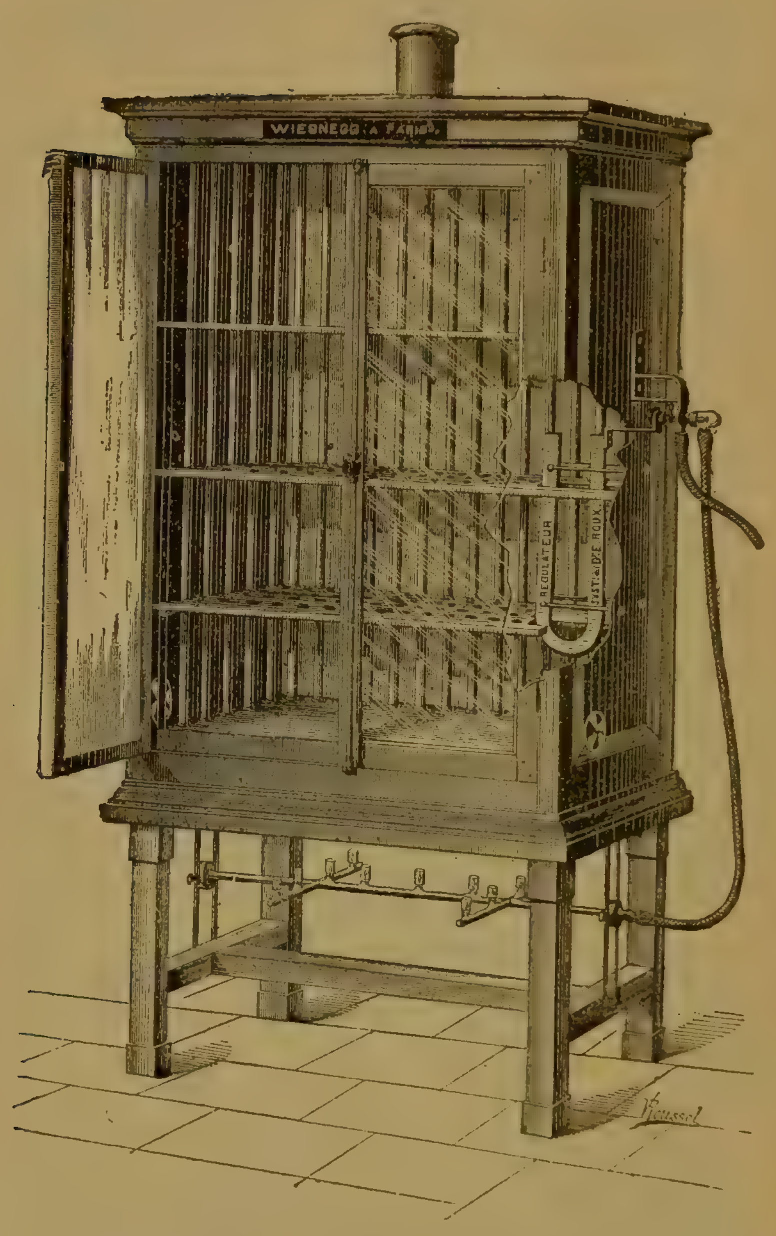


Fig. 4. — Étuve à air de Roux.

étuves à eau. La figure ci-jointe représente l'étuve à air de Roux (seule employée aujourd'hui) avec ses compartiments, sa rampe de gaz et son régulateur bimétallique (fig. 4). Les cultures ayant besoin d'être

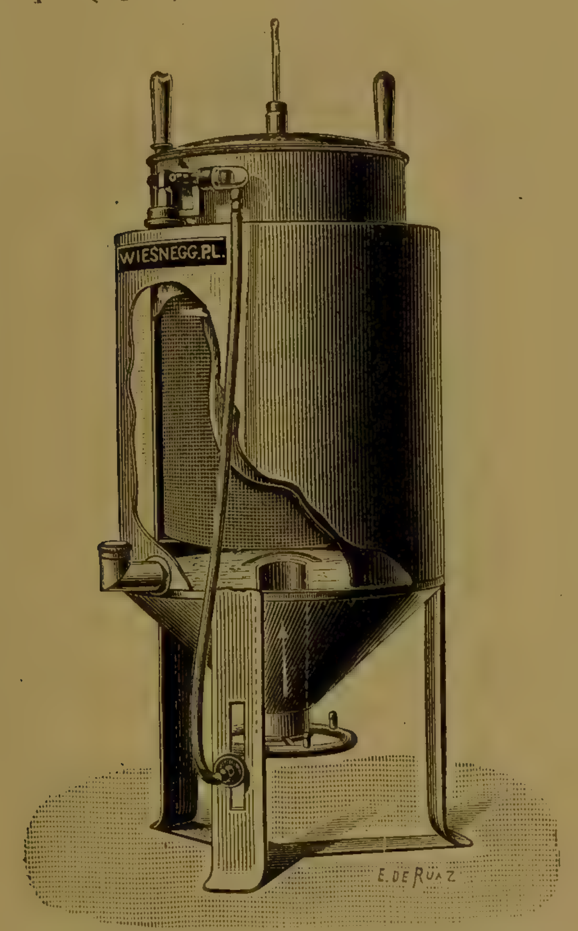


Fig. 5. — Étuve à eau de Roux.

protégées contre l'action nocive de la lumière, on fera bien de coller du papier noir sur les vitres. Il est indispensable de disposer au moins de deux étuves à air. L'une, réglée à 22°, sera réservée aux cultures dans

la gélatine, l'autre, réglée à 37°, servira aux cultures

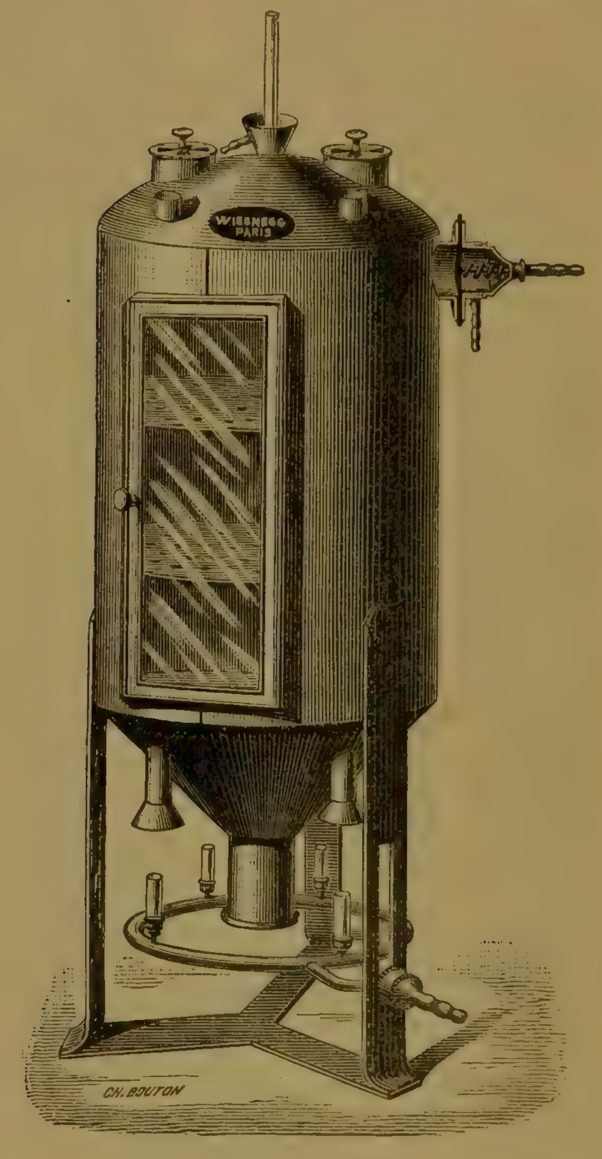


Fig. 6. — Étuve de d'Arsonval.

sur les autres milieux. Les dimensions intérieures

des modèles les plus usités (Wiesnegg) sont les suivantes :

	HAUTEUR	PROFONDEUR	LARGEUR
	—	—	—
Grand modèle. . .	1,28	0,52	0,40
Modèle moyen. . .	0,90	0,37	0,58
Petit modèle. . . .	0,50	0,29	0,40

Les étuves à eau peuvent être munies d'un régulateur de Roux (fig. 5) ou d'un régulateur de d'Arsonval (fig. 6). Les premières sont généralement préférées. On trouve facilement dans le commerce, et à des conditions de prix avantageuses, des étuves de d'Arsonval transformées en étuves de Roux. Un seul petit modèle sera généralement suffisant [celui de Wiessnegg par exemple ; hauteur : $0^{m},35$ — diamètre : $0^{m},25$ (dimensions intérieures) — épaisseur de la couche d'eau : $0^{m},055$], mais il est bon d'en posséder deux exemplaires, dont l'un, réglé exactement à 38,5, sera destiné exclusivement à la culture des bacilles tuberculeux et morveux.

Il faut savoir qu'au point de vue de la fixité de la température, les étuves à eau l'emportent de beaucoup sur les étuves à air, mais elles sont plus coûteuses et d'un poids bien plus considérable, ce qui les fait abandonner lorsqu'il s'agit de grands modèles.

2° **Coagulateur de Koch.** — Indispensable pour la préparation des tubes de sérum. Le modèle suivant (Wiessnegg) : $0^{m},35$ de côté — $0^{m},06$ de hauteur — épaisseur de la couche d'eau : $0^{m},035$, suffit amplement. Il sera muni d'un régulateur de Roux.

3° **Appareils à faire le vide.** — La pompe à mercure permet d'obtenir dans les vases de culture un vide absolument parfait, mais son prix de revient demeure très élevé et nous croyons qu'on peut fort bien s'en passer. Combiné avec le rinçage par un gaz inerte,

le vide approximatif obtenu à l'aide de la trompe à eau suffit parfaitement dans les conditions ordinaires de l'étude des microbes anaérobies. La trompe se recommande, non seulement par la modicité de son prix, mais encore par la simplicité de sa disposition et de son fonctionnement. Elle sera installée dans la grande salle, au-dessus de l'évier. Les meilleures trompes sont les trompes métalliques, notamment celles que construit la maison Golaz. Les trompes en verre, par exemple celle d'Alvergniat, sont très fragiles ; on ne leur donnera la préférence que quand il s'agira d'appareils à grand débit, destinés à faire passer des courants d'air dans les vases de culture ; elles ont alors l'avantage d'un prix moins élevé.

4° **Balances.** — L'usage de la balance de précision est limité en bactériologie. On pourrait réaliser une économie assez considérable en recourant, le cas échéant, à celle d'un laboratoire de chimie voisin. Une balance sensible au gramme est nécessaire pour la pesée de la viande, de la gélatine, etc. Une seconde balance, sensible au centigramme, servira à la pesée de la peptone, du sel marin et des autres produits qui entrent pour une faible proportion dans la composition des milieux nutritifs.

5° **Glacière** (fig. 7). — La glacière est très utile pour la conservation des cultures et d'un grand nombre de produits virulents. Dans nos climats, elle pourra aussi servir, du mois de juin au mois de septembre, cultures sur gélatine. C'est dire que ses dimensions doivent être assez considérables. La glacière occupera naturellement l'en-



Fig. 7. — Glacière.

droit le plus frais du laboratoire. Si celui-ci possède une cave, elle y sera donc placée. Pour les cultures en gélatine, on remplacera avantageusement la glacière par une étuve munie d'un système de tubes dans lesquels on peut faire circuler de l'eau froide, mais cette étuve est d'un prix coûteux. Il va sans dire que, destinée aux cultures, la glacière ne devra pas être maintenue à la température classique (4°).

6° **Petit bain-marie cylindrique** ($0^m,26$ sur $0^m,22$ par exemple) muni d'un régulateur de Roux.

7° **Appareil à distiller.**

8° **Appareils et objets divers** (moins la verrerie).

Réchauds à gaz de plusieurs grandeurs.

* Lampes à alcool.

Becs de Bunsen à flamme éclairante et chauffante. Les meilleurs sont les becs Adnet et Garros (fig. 8); on les préfèrera au bec à virole.

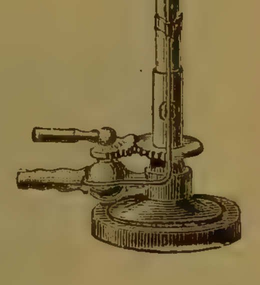


Fig. 8. — Bec Garros.

* Fils et anses de platine.

Petites spatules en nickel, pour les ensemencements (fig. 9).

Fig. 9. — Spatule de nickel.

Porte-tubes en bois (fig. 10) ou en fil de fer galvanisé.

* Paniers métalliques, pour stériliser les tubes, remplis ou non de milieux de culture (fig. 11 et 12).

* Cylindres en carton ou en fer-blanc, destinés à contenir les tubes rem-



Fig. 10. — Support pour tubes à essai.

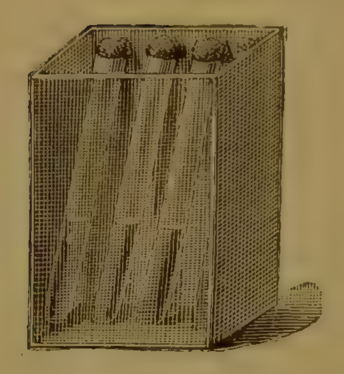


FIG. 11. — Panier en toile métallique, pour tubes à essai.



FIG. 12. — Panier en fil de fer galvanisé, pour tubes à essai.

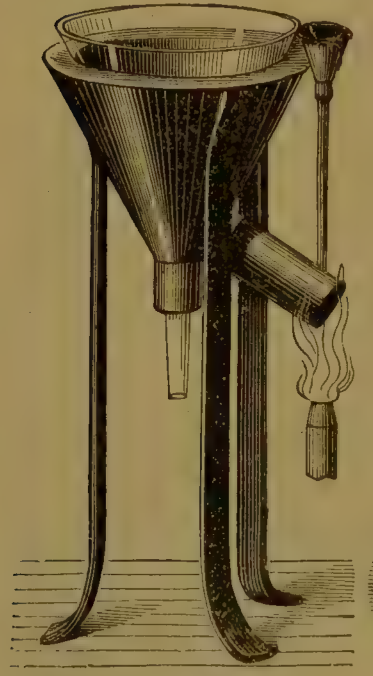


FIG. 13. — Entonnoir pour filtration chaude.

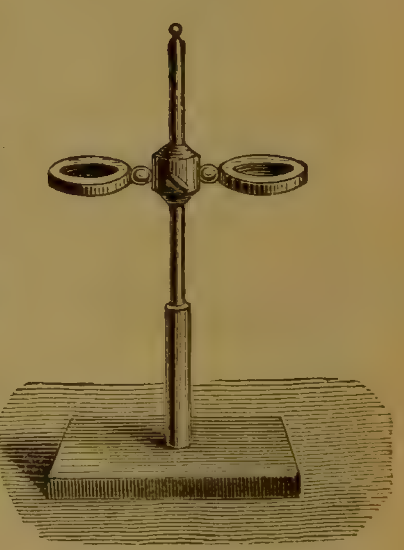


FIG. 14. — Support pour entonnoirs.

plis de milieux de culture, avant et après leur ensemencement.

* Entonnoir pour filtration chaude (fig. 13).

Supports en bois pour entonnoirs (fig. 14). Supports universels en métal (fig. 15).

* Casseroles en tôle émaillée, de plusieurs grandeurs.

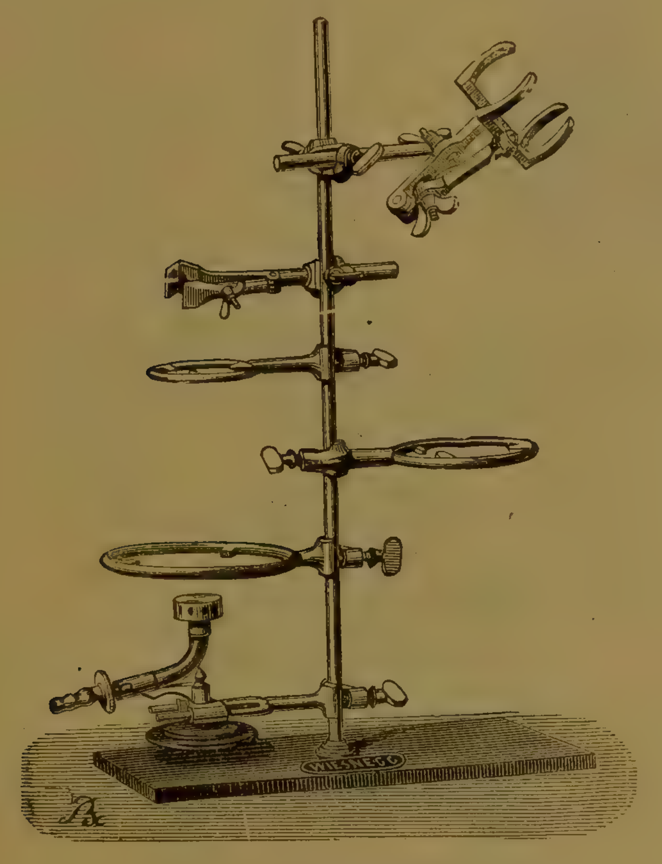


Fig. 15. — Support universel.

* Pots à lait d'un et de deux litres, en tôle émaillée.

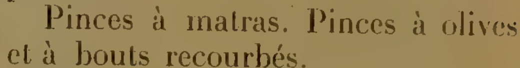
Entonnoirs en tôle émaillée.

Presse-viande (fig. 16).

Couteaux à lame d'argent ou emporte-pièce de Queyrat, pour débiter les pommes de terre.

Mortiers en porcelaine.

* Capsules en porcelaine et en tôle émaillée.



Pinces à matras. Pinces à olives et à bouts recourbés.

Couteaux à verre, limes, rapes.

* Assortiment de bouchons de caoutchouc à 1, 2 et 3 trous.

* Capuchons de caoutchouc pour tubes à essai.

* Thermomètres allant jusqu'à 200° (four à flamber), jusqu'à 60° (étuves) et jusqu'à 110° (expériences diverses).

Fig. 16. — Presse viande.

Cercles en paille pour supporter les ballons à fond arrondi.

* Bouchons de liège.

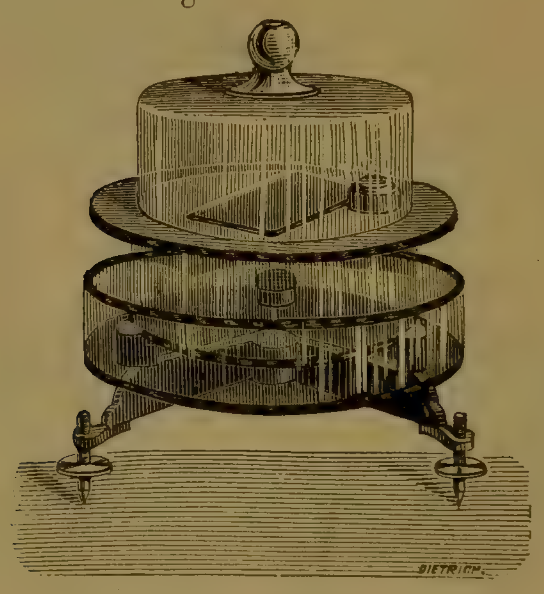


Fig. 17. — Plaque refroidissante de Koch.

* Toile métallique.

* Papier filtre ordinaire (donner la préférence au

papier gris, plus résistant et plus économique que le papier blanc) et filtres à précipités tout découpés (Schleicher et Schüll).

* Papier Chardin.

* Cire Golaz.

* Papier de tournesol, bleu et rouge.

Trépieds.

Plaques refroidissantes de Koch, ou mieux de Roux (fig. 17-18).

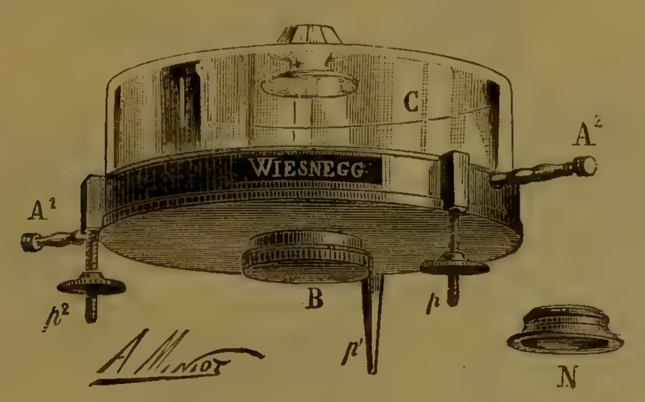


Fig. 18. — Plaque refroidissante de Roux.

Appareil à hydrogène.

Coton de verre et coton d'amiante.

C. Appareils servant a l'étude microscopique

1° **Microscopes** (Zeiss, Leitz, Stiassnie, Reichert, Nachet). Chambre claire.

2° **Microtomes.** — La recherche des microbes dans les tissus exige qu'on débite ceux-ci en coupes extrêmement minces. Le microtome à main de Ranvier n'est d'aucun secours en bactériologie et un bon microtome mécanique s'impose. Le modèle de Malassez

(fig. 19) suffit à la rigueur, mais on lui préfère généralement les appareils de Minot, Schanze, Jung ou le microtome à bascule, dit Rocking.

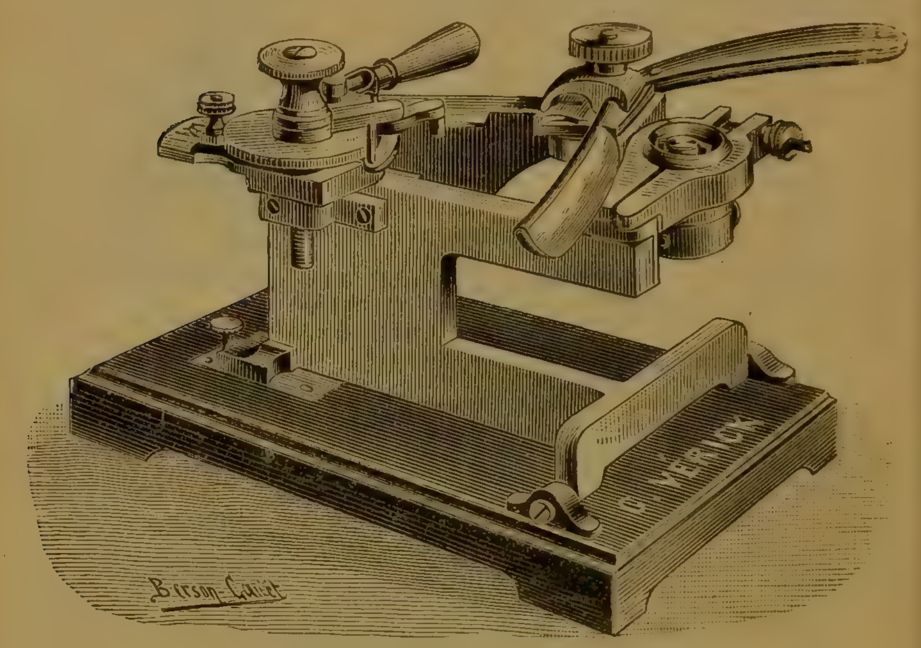


Fig. 19. — Microtome de Malassez.

3° **Centrifugeurs** (fig. 20). — Les microbes pathogènes sont parfois fort peu abondants dans les humeurs ou produits pathologiques, tel le bacille de Koch dans l'urine et les épanchements. Ils risquent fort de passer inaperçus, si on se contente de les rechercher dans le sédiment d'un verre conique. D'où l'emploi des centrifugeurs. Ceux de la maison Krauss se recommandent par leur excellente construction. On pourra n'en posséder qu'un seul, mais de moyennes dimensions.

4° **Appareil Thoma-Zeiss** pour la numération des globules sanguins.

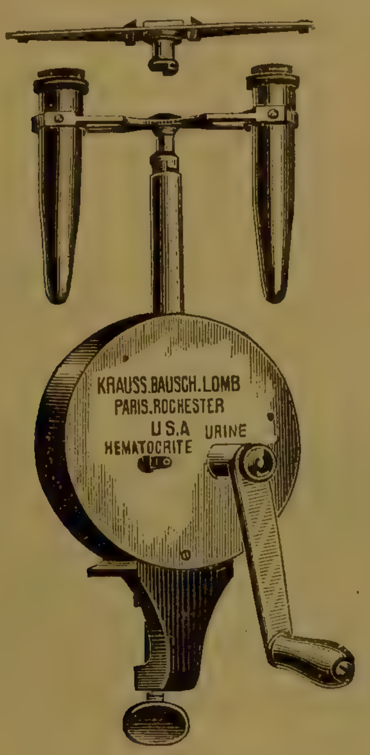


Fig. 20. — Centrifugeur de Krauss.

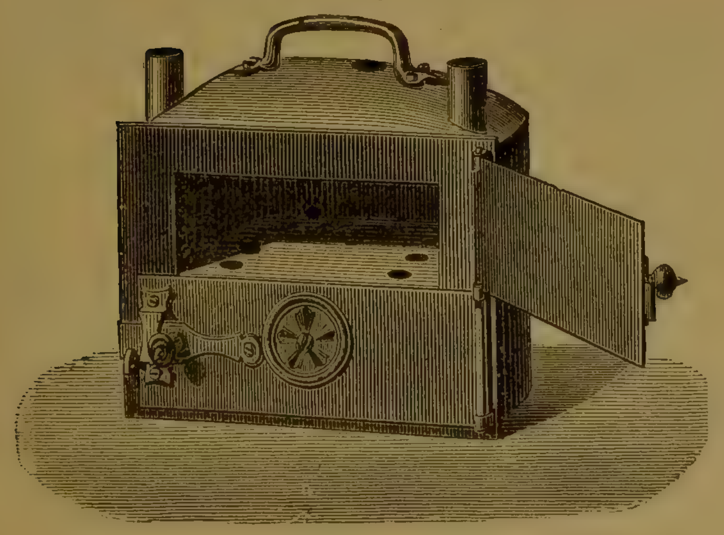


Fig. 21. — Étuve de Gay-Lussac.

5° **Étuve de Gay-Lussac** (fig. 21). — Le modèle courant de Wiessnegg [haut. : 0m,14 — profondeur :



FIG. 22. — Cellule de Koch.

0m,15 — larg. : 0m,18 (dimensions intérieures) — épaisseur de la couche d'eau : 0m,03] sera indispen-

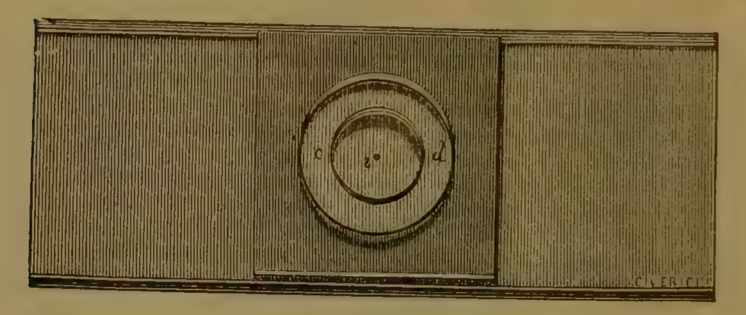


FIG. 23. — Cellule de Ranvier.

sable pour les inclusions dans la paraffine. Il est bon de munir l'étuve d'un régulateur de Roux.



FIG. 24. — Pince de Cornet.

6° **Objets divers.** — * Lames et lamelles.

Cellules de Ranvier ou de Koch (fig. 22-23), anneaux de verre.

* Verres de montre de diverses grandeurs.

* Pinces de Cornet (fig. 24) et de Debrand.

Table à étages (fig. 25).

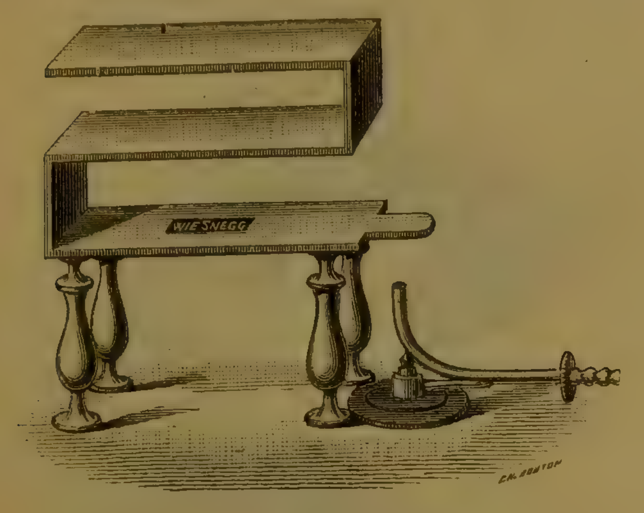


Fig. 25. — Table à étages.

Platine chauffante (Ranvier, Vignal, Schultze ou Pfeiffer).

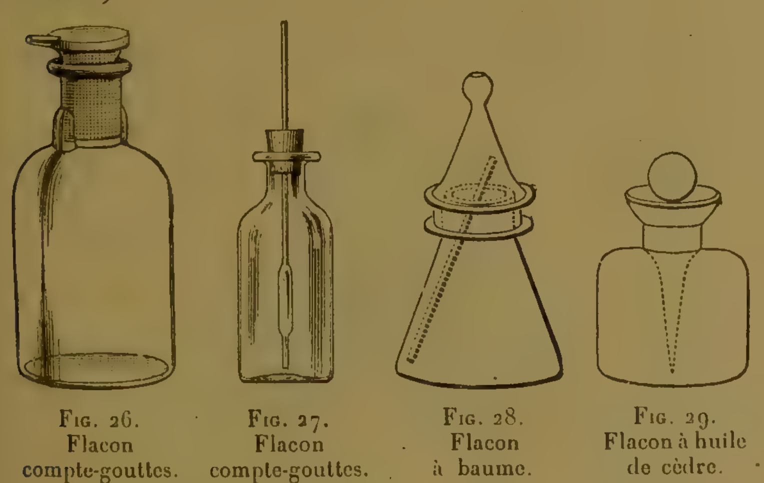


Fig. 26. Flacon compte-gouttes. Fig. 27. Flacon compte-gouttes. Fig. 28. Flacon à baume. Fig. 29. Flacon à huile de cèdre.

Aiguilles à dissection, ciseaux fins (droits et courbes), pinces fines.

* Papier de soie.
* Flacons compte-gouttes (fig. 26-27).

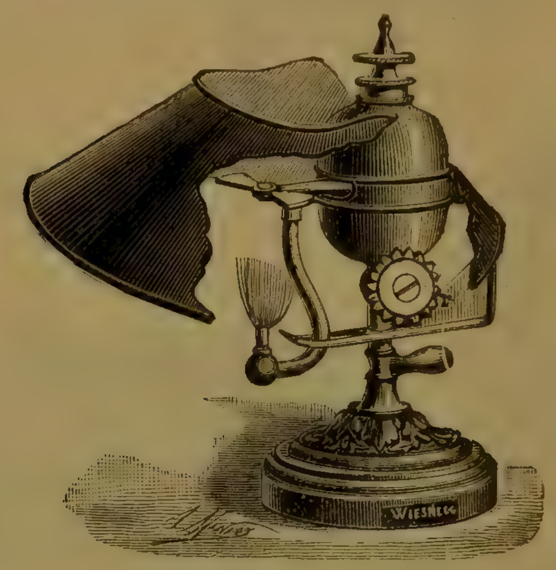


Fig. 30. — Lampe à albo-carbone.

* Flacons à baume de Canada (fig. 28) et à huile de cèdre (fig. 29).

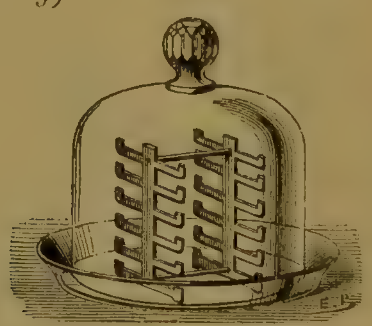


Fig. 31. — Chambre humide à étagères de Malassez.

Lampe à albo-carbone (fig. 30).
Bec Auer (préférable à la lampe à albo-carbone).
Chambre humide à étagères de Malassez (fig. 31).

D. Appareils servant aux inoculations, a la préparation des sérums, etc.

1° **Plateaux en zinc** avec rebords percés de trous. On en possédera de différentes grandeurs, correspondant aux divers animaux usités dans le laboratoire.

2° **Mors de Malassez. Appareil de Latapie. Gouttière de Cl. Bernard.**

3° **Balance ordinaire** pour les animaux de laboratoire, et bascule pour les animaux plus grands.

4° * **Seringues** (Strauss-Colin, Roux, Debove). Plusieurs grandeurs sont indiquées : 20 centimètres cubes



Fig. 32. — Aiguille à baïonnette.

(seringue à sérothérapie), 10 centimètres cubes, 5 centimètres cubes, 2 centimètres cubes, 1 centimètre cube. — Aiguilles, de longueur et de diamètre variés ; aiguilles courbes au besoin. Corps de pompe, pistons et rondelles de rechange.

5° **Injecteurs de Chabaud** (100 centimètres cubes, 250 centimètres cubes, 500 centimètres cubes), avec ajutages métalliques, aiguilles à baïonnette (fig. 32) et caoutchouc Martin. — Injecteur à poire, facile à improviser (fig. 33).

6° **Instruments variés.** — * Bistouris, lancettes, pinces, ciseaux, pinces à forcipressure, grandes pinces pour la préhension des rats.

* Aiguilles à suture et aiguille de Reverdin.

Pinces américaines pour les inoculations intra-veineuses.

* Rasoirs.

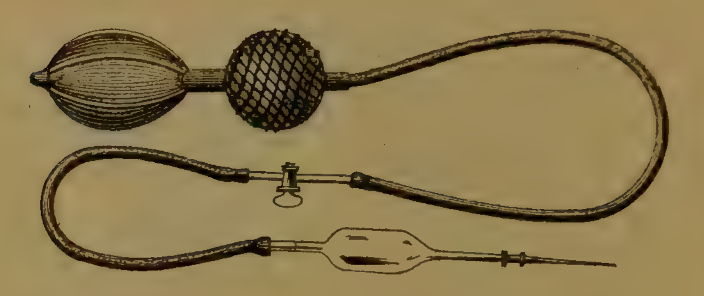


Fig. 33. — Injecteur à poire.

Trépan, foret.

Lacets de cuir pour attacher les animaux.

* Boîtes en tôle émaillée pour faire bouillir les instruments (le modèle suivant par exemple ; longueur : 0m,20 — largeur : 0m,12 — hauteur : 0m,95).

Trocarts appropriés pour saigner les grands animaux.

Fil de soie, catgut.

* Thermomètres pour les grands et les petits animaux.

Dialyseur.

Plaques de liège.

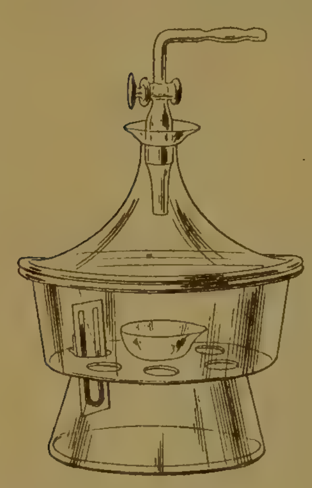


Fig. 34. — Exsiccateur de Chancel.

7° **Exsiccateurs.** — Petit modèle en verre (Chancel (fig. 34) et exsiccateur métallique Wiesnegg (fig. 35) en forme d'autoclave couché [le type suivant est très pratique : lon-

gueur : $0^{m},35$ — diamètre : $0^{m},265$ (dimensions intérieures)].

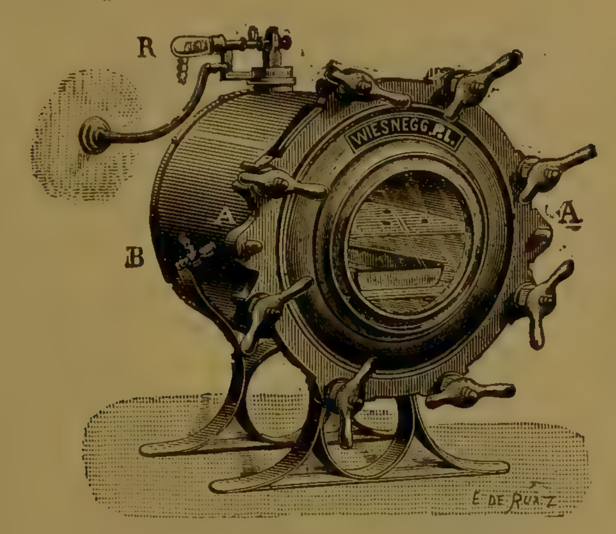


Fig. 35. — Exsiccateur de Wiessnegg.

E. Verrerie

La verrerie représente la plus grande partie du matériel d'un laboratoire de bactériologie. Il y a avantage à faire faire nombre d'appareils en verre vert, lequel est plus résistant à la chaleur et moins alcalin que le verre blanc. Il y a aussi avantage à fabriquer soi-même le plus possible d'appareils : on possédera donc à cet effet une *soufflerie* (fig. 36) ou tout au moins une *lampe d'émailleur*.

Voici la liste des principaux objets en verre qu'on devra se procurer :

* Tubes à essai pour cultures.

* Tubes de Roux, pour cultures sur pommes de terre.

Fioles de Gayon.

Fioles d'Erlenmeyer.

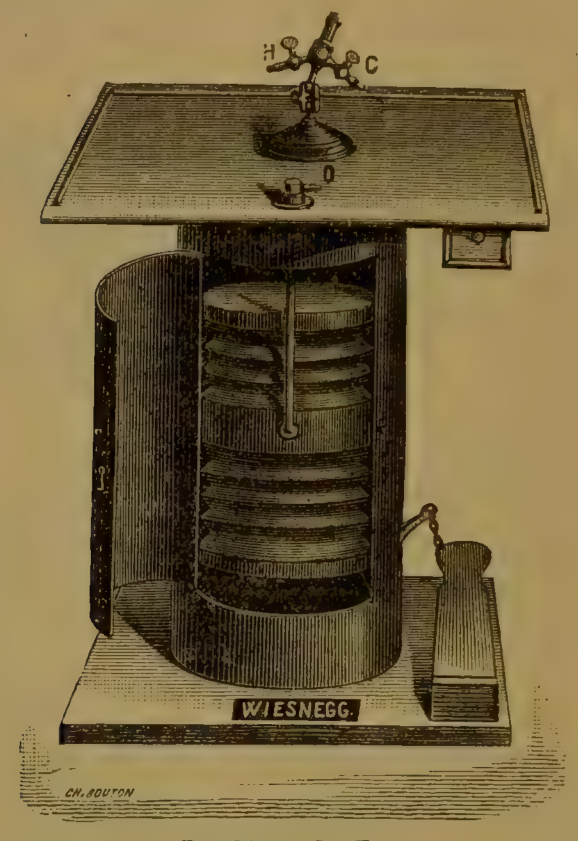


Fig. 36. — Soufflerie.

* Boîtes de Pétri (on les préférera, pour les sépa-

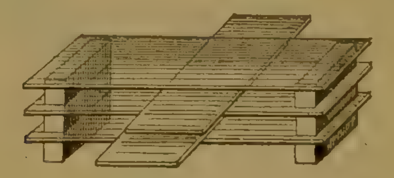


Fig. 37. — Plaques de Koch.

rations, aux plaques de Koch, lesquelles se disposent

dans des cristallisoirs sur des supports de verre, comme l'indique notre figure) (fig. 37).

Matras Pasteur.

* Verres à expérience, de différentes grandeurs.

* Entonnoirs de diverses grandeurs également.

* Ballons à fond plat de plusieurs capacités (quelques-uns serviront à faire des pissettes — fig. 38).

Ballons à fond arrondi (à col ordinaire et à long col).

* Éprouvettes de différentes tailles, les unes graduées, les autres non graduées.

Cloches pour microscopes et pour préparations.

* Cristallisoirs de différentes dimensions, quelques-uns à bords rodés et munis d'un couvercle à rainure.

Fig. 38. — Pissette.

Grands flacons de 5 à 10 litres de capacité, munis d'un robinet en verre et destinés à contenir des solutions antiseptiques (fig. 39).

* Ballons-pipettes Chamberland.

Carafes jaugées à 50 centimètres cubes, 100 centimètres cubes, 250 centimètres cubes, 500 centimètres cubes, 1 litre.

Conserves en verre de grande taille, pour placer les rats et les souris (avec couvercle en toile métallique bordé de plomb) (fig. 40).

Fig. 39. — Flacon à robinet.

Vases à précipités (fig. 41) de différentes dimensions.

Flacons à 2-3 tubulures et flacons à tubulure inférieure.

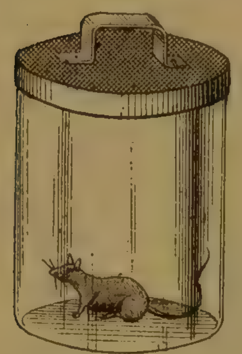


Fig. 40. — Conserve en verre pour rats et souris.

* Pipettes graduées de 2, 9 et 20 centimètres cubes (le premier modèle divisé en dixièmes de centimètre cube).

Pipettes de précision donnant 50 gouttes au centimètre cube (pour les analyses d'eaux).

Burettes de Mohr.

Pinces de Mohr, Hofmann et Monselice.

Alcoomètre — Albuminimètre d'Esbach — Pèse lait — Pèse-urine.

Aéromètres Baumé pour liquides plus denses et moins denses que l'eau.

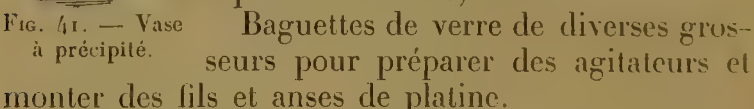


Fig. 41. — Vase à précipité.

Tubes de Laveran pour l'analyse de l'air.

Assortiment complet de tubes de verre, minces et épais, de différents diamètres, pour la confection des pipettes Pasteur, des tubes à essai et à pomme de terre, etc.

Baguettes de verre de diverses grosseurs pour préparer des agitateurs et monter des fils et anses de platine.

F. — Produits chimiques

Ils varient beaucoup — cela va de soi — avec la nature des recherches qui sont effectuées dans le laboratoire. Voici la liste des plus usuels :

* Acétone (à 56°-58°).

Acide acétique cristallisable.

* Acide chlorhydrique brut ; pur ; et à 16° Baumé.

Acide chromique.

Acide lactique.
Acide nitrique pur.
Acide osmique.
* Acide phénique pur et brut (acide carbolique).
Acide phosphorique.
Acide picrique.
Acide pyrogallique.
Acide sulfurique pur et brut.
Acide tartrique.
* Alcool absolu et alcool à 90°.
Alcool amylique.
Alcool méthylique.
Aluns de potasse et d'ammoniaque.
Amidon.
Ammoniaque à 22°.
Carbonate d'ammoniaque.
Phosphate d'ammoniaque.
Sulfate d'ammoniaque.
Tartrate d'ammoniaque.
Huile d'aniline.
Chlorhydrate d'aniline.
Nitrate d'argent.
Asparagine.
Chlorure de baryum.
Baume de Canada.
* Bleu de méthylène.
* Bleu polychromatique de Unna (Grübler).
* Borax.
Chaux caustique.
Carbonate de chaux.
Chlorure de calcium.
Chlorure de chaux.
Sulfate de chaux.
* Carmin.
Caséine.
Celloïdine.

Charbon animal.
* Chloroforme.
Cocaïne.
* Collodion (non riciné).
* Crésyl (Jeyes).
* Tricrésol (Schering).
Sulfate de cuivre.
Curare.
Dahlia.
Dextrine.
Diphénylamine.
* Éosines à l'eau et à l'alcool.
Éther à 66°.
Essence de moutarde.
Sulfate ferreux.
Formol.
* Fuchsine.
Fuchsine acide.
* Gélatine (marque extra-blanche).
* Gélose.
* Glucose.
* Glycérine à 30°, neutre.
* Hématéine.
Sulfo-indigotate de soude.
Induline.
Iode.
Iodure de potassium.
* Lactose.
Lévulose.
Carbonate de lithine.
Carbonate de magnésie.
Sulfate de magnésie.
Mannite.
* Bichlorure de mercure.
Teinture d'opium.
Orange.

Paraffines molle et dure (fondant à 45° et à 50°).
* Peptone (Chapoteaut, Aschmann, Witte).
Phénolphtaléine (qu'on dissout au 30e dans l'alcool à 90°).
Phlorhydzine.
Potasse caustique.
Carbonate de potasse.
Chromate neutre et bichromate de potasse.
Nitrite de potasse.
Oxalate de potasse.
Permanganate de potasse.
Phosphate de potasse.
Polysulfure de potassium.
Silicate de potasse.
Rouge magenta.
Rouge neutre.
Saccharose.
Safranines à l'eau et à l'alcool.
* Soude caustique.
Acétate de soude.
* Carbonate de soude.
* Chlorure de sodium pur et brut.
Citrate de soude neutre.
Fluorure de sodium.
Formiate de soude.
Nitroprussiate de soude.
Phosphate bisodique.
Sulfate de soude.
Tanin.
* Thionine.
Thymol.
Toluol.
Vaseline et huile de vaseline.
Vert de méthyle.
Vesuvine.
Violet de cristal.

* Violet de gentiane.
* Xylol.
Sulfate de zinc.

III. *Laboratoires improvisés.*

L'installation d'un laboratoire de bactériologie est, on le voit, chose assez compliquée. Elle nécessite une instrumentation très nombreuse et très spéciale. Mais est-ce à dire que la microbiologie soit fermée à tous ceux qui habitent en dehors des grands centres, aux praticiens des petites villes et des campagnes, aux médecins de la marine et des colonies. Assurément non. Les appareils usités en bactériologie ne sont pas tous si particuliers qu'ils ne puissent être remplacés dans certains cas par des appareils de fortune. Des laboratoires rudimentaires peuvent s'improviser partout; des découvertes nombreuses, et non des moindres, ont vu le jour dans de telles conditions.

Un médecin de campagne est destiné nécessairement à s'occuper surtout de bactériologie clinique. Il dispose en général de ressources modestes qui ne lui permettent pas l'acquisition d'un grand nombre d'appareils. Il fera bien de consacrer à l'achat d'un bon microscope une grande partie de son budget de laboratoire. Pour ce qui est de la verrerie et des réactifs, il s'en tiendra au strict nécessaire. Il remplacera le four Pasteur par un simple fourneau de cuisine ou mieux par un four de boulanger. La verrerie sera mise au four avec le pain et retirée avec lui. La stérilisation est alors largement suffisante. En effet, dans les fours ordinaires, la température de cuisson du pain est d'environ 225° (Wagner). Dans les fours Biahaud et Lamoureux, qu'utilisent les grandes administrations, cette température atteint même,

d'après les expériences de M. Balland, de 270 à 300 degrés. L'autoclave Chamberland est plus difficile à remplacer. On peut toutefois y suppléer à l'aide d'un stérilisateur construit à bon marché ou à l'aide d'une de ces lessiveuses qu'on trouve actuellement dans un grand nombre de ménages et que M. Berthier a appris à utiliser ponr la désinfection. Plus délicat est le problème des étuves. Le gaz d'éclairage est presque indispensable à leur bon fonctionnement. L'étuve de Lion au pétrole atteint un prix élevé ; elle nécessite une surveillance constante et ne met pas à l'abri d'écarts thermiques souvent considérables. Deux modèles de Wiesnegg permettent d'utiliser un combustible quelconque ; ils sont passibles des mêmes reproches que l'étuve de Lion. Tous trois ne réalisent pas un progrès bien sensible sur une étuve très simple que chacun peut improviser soi-même avec deux caisses en fer-blanc (boîtes à biscuits, boîtes à pétrole, etc.) de diamètre inégal, soudées l'une dans l'autre de façon à laisser entre elles un intervalle qu'on remplit d'eau ; l'ensemble est monté sur des pieds. La température sera indiquée par un thermomètre passant au travers du couvercle de fer-blanc qui ferme l'appareil. Enfin le liquide interposé entre les deux parois est chauffé à l'aide d'une ou plusieurs veilleuses, qu'on rapproche ou qu'on éloigne plus ou moins de la face inférieure de la caisse.

Lorsqu'on est véritablement dépourvu de tout, on pourrait utiliser à la rigueur la chaleur humaine pour cultiver les microbes. Quelques praticiens ont observé en effet le développement du bacille de Löffler à la surface d'un tube de sérum enveloppé de coton et maintenu dans la poche intérieure de leur gilet. Il y a également lieu de se demander si la chaleur du fumier de ferme ne pourrait pas être de quelque secours. Plusieurs médecins militaires ne l'ont-ils pas

employée avec succès dans les casernes pour élever la température de l'eau des bains?

Le bactériologue peut être envoyé en mission à l'occasion d'une épidémie, de l'étude d'une maladie peu connue, etc., dans un pays lointain, non civilisé, où il devra improviser un laboratoire sans trop compter sur les ressources locales. Il lui faudra donc prendre avec lui tout son matériel. C'est dire que celui-ci devra tenir le moins de place possible et être très portatif. Une caisse, facile à arrimer sur une monture quelconque, contiendra un autoclave à pétrole dans lequel se feront toutes les stérilisations. La verrerie, réduite autant que faire se pourra, sera soigneusement emballée. La gélatine, la gélose, les substances colorantes, etc... devront être réparties dans des paquets pesés avant le départ. L'étuve sera improvisée de la façon indiquée, à moins qu'on ne possède un petit modèle à pétrole. Enfin les animaux d'inoculation seront empruntés au pays. En conséquence, le principal rôle du bactériologue consistera trop souvent à recueillir dans les meilleures conditions possibles des produits qu'il se réservera d'étudier ultérieurement.

Toutefois, si c'est sur un navire (même d'un faible tonnage) que le laboratoire de bactériologie doit être improvisé, les conditions changent et se présentent sous un jour bien plus favorable. Le médecin ne se trouve plus guère limité au sujet du nombre et des dimensions des objets à emporter. Il peut prendre avec lui des animaux d'expérience. Le navire lui-même offre des ressources précieuses. Il est toujours possible de trouver à proximité de la chaudière un réduit, voire même une chambre, dont la température se maintient d'une façon assez constante aux environs de 34°-36° et qui peut être parfaitement utilisé comme étuve. Le four de boulanger, l'étuve à désinfection serviront pour la stérilisation de la verrerie et des milieux nutri-

tifs. La glacière rendra les plus grands services pour la conservation des virus et les cultures sur gélatine.

La composition d'un laboratoire portatif est donc susceptible de varier dans d'assez grandes limites suivant le but scientifique qu'on se propose et les conditions que l'on doit rencontrer. Les objets désignés par une astérisque dans l'énumération précédente sont les plus importants. On y joindra des réchauds à pétrole ou même à alcool. Notons encore que dans les laboratoires portatifs, on pourrait songer à remplacer les plaques de Koch, les fioles de Gayon, les boîtes de Petri et les autres appareils de verrerie destinés aux cultures sur milieux solides, par des feuilles de carton à bords légèrement relevés. Elles présenteraient l'avantage d'un transport extrêmement facile et d'un poids des plus minimes. Au moment du besoin, ces feuilles (stérilisées d'avance) seraient disposées sur une plaque de verre flambée, sous une cloche stérilisée. On verserait à leur surface la gélatine ou la gélose. On pourrait aussi, comme l'a indiqué M. Miquel, tremper, avant le départ, dans de la gélose liquéfiée, des feuilles de papier bristol stériles, qu'on ferait ensuite sécher à l'abri de toute souillure. Les plaques ainsi obtenues ne sont pas fertiles à l'état sec. Mais, convenablement humectées au moment de l'ensemencement, elles peuvent servir à cultiver les bactéries.

CHAPITRE II

LE MICROSCOPE

I. *Description sommaire du microscope.*

La nécessité d'un bon microscope, en technique bactériologique, n'a pas besoin d'être longuement démontrée. Si les protozoaires, les moisissures, les levures, les streptothricées et certaines bactéries (la bactéridie charbonneuse, par exemple) présentent des dimensions relativement considérables et peuvent être vus, voire même étudiés, avec de faibles grossissements et des instruments quelconques, d'autres organismes, extrêmement ténus, nécessitent pour être aperçus à grand'peine un pouvoir amplifiant de 2 000 diamètres et un éclairage intensif. C'est le cas du microbe de la péripneumonie, découvert par MM. Nocard et Roux. D'autres agents pathogènes, dont l'existence est cependant certaine — tel celui de la fièvre aphteuse — sont plus petits encore. Ils ont des dimensions de même ordre que les longueurs d'ondes lumineuses et échappent, par conséquent, à toute espèce d'examen microscopique. Entre les deux extrêmes, il y a place pour une foule d'intermédiaires. L'importance d'un bon instrument ressort nettement de ces quelques considérations.

Le microscope (fig. 42) se compose de deux par-

ties : une *partie mécanique* et une *partie optique*. Étudions-les successivement.

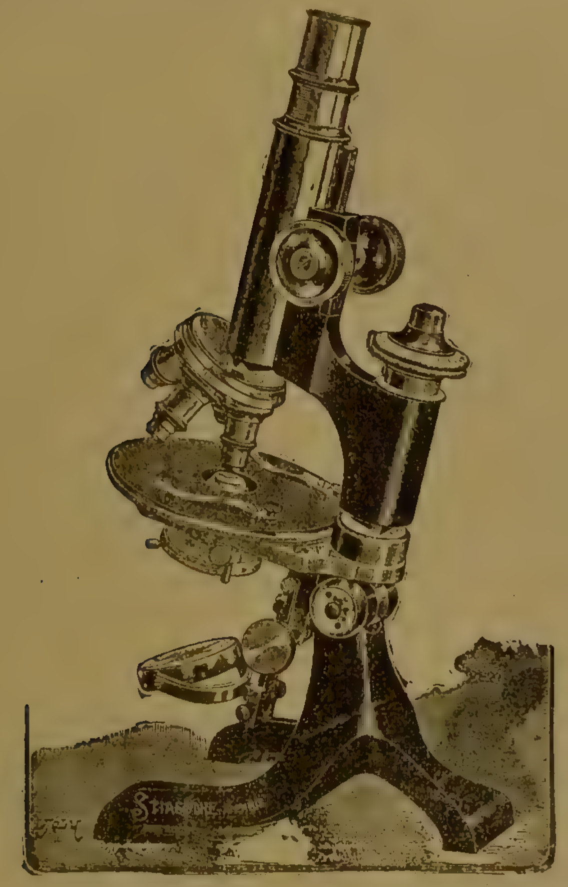


Fig. 42. — Microscope Stiassnie (Modèle de l'Institut Pasteur).

1° PARTIE MÉCANIQUE

Elle comprend un *pied*, sur lequel est fixée une *colonne* rigide. Celle-ci porte à sa partie inférieure un *miroir* — à sa partie moyenne une *platine*, pour placer l'objet à examiner ; et deux anneaux destinés à

enclaver, l'un un *diaphragme* mobile, l'autre un *condensateur* — à sa partie supérieure, une branche horizontale, terminée par une douille dans laquelle glisse le *tube* en laiton qui supporte la partie optique de l'instrument.

Le *pied* du microscope sera lourd et stable. La forme en fer à cheval est celle qui remplit le mieux ces deux conditions. C'est par le pied, et non par la colonne, qu'il faut toujours saisir le microscope.

La *colonne* doit être articulée de façon à pouvoir prendre telle inclinaison que l'on désire. Dans ce mouvement elle entraîne la platine, le miroir et le tube.

Le *miroir* aura deux faces réfléchissantes différemment conformées, l'une plane et l'autre concave. Il doit être mobile dans tous les sens.

La *platine* est une plaque de cuivre noirci ou d'ébonite, percée en son centre d'une ouverture pour le passage des rayons lumineux réfléchis par le miroir. Elle porte deux valets, ou ressorts en laiton, destinés à maintenir la préparation. L'ouverture peut être agrandie ou diminuée au moyen d'un *diaphragme*. Il est des diaphragmes en forme de disque, de cylindre. On leur préférera le dispositif dit iris, d'un maniement plus commode. Il présente cet avantage que, composé de plaques de métal courbes imbriquées les unes sur les autres, son ouverture est susceptible de varier de diamètre d'une manière tout à fait graduelle.

Certaines platines sont fixes. On est alors obligé de manœuvrer la préparation avec les doigts, ce qui, à moins d'une très grande habileté, constitue un sérieux inconvénient. On emploiera de préférence les platines mobiles qui permettent d'imprimer à l'objet examiné un mouvement régulier suivant deux directions perpen-

diculaires, soit que la platine effectue réellement ces deux déplacements, soit qu'ils soient obtenus à l'aide d'un mouvement excentrique.

Les préparations microscopiques demandent parfois à être maintenues à une température déterminée, constante. Il est bon d'avoir à cet effet une *platine chauffante* qu'on adaptera à la platine proprement dite.

A la platine se fixent également les *condensateurs*, dont l'idée première revient à Wollaston et qui sont destinés à renforcer l'intensité lumineuse fournie par le miroir. Le seul en usage aujourd'hui est le condensateur Abbé.

Le *tube* du microscope se compose de deux cylindres rentrant l'un dans l'autre ; il en résulte qu'on peut augmenter la longueur totale de l'instrument et par suite amplifier l'image microscopique. Le tube doit être muni à son extrémité inférieure d'un *revolver*, permettant de faire se succéder tour à tour au-dessous de lui, sans avoir besoin de les visser chaque fois, deux ou trois objectifs. Pour rapprocher ou éloigner les lentilles de l'objet placé sur la platine, c'est-à-dire pour mettre au point, on peut prendre le tube à la main et l'enfoncer ou le retirer doucement dans la douille, comme par un mouvement de vis. Une mise au point plus exacte est obtenue à l'aide d'un *pignon* qui s'engrène sur une crémaillère. Enfin, une *vis micrométrique*, commandée par un bouton, permet de réaliser d'une manière sûre et précise les petits mouvements d'élévation et d'abaissement du système optique, nécessaires à l'examen des différentes couches de l'objet étudié. — Notons que les revolvers doivent porter des numéros correspondant aux numéros des objectifs et que, pour obtenir un bon centrage, il est indispensable de visser chaque objectif à sa véritable place.

2° PARTIE OPTIQUE

La *partie optique* du microscope comprend l'*oculaire* et l'*objectif*.

L'*oculaire* se compose d'une première lentille plan convexe, à convexité tournée par en bas, ou verre frontal. A ce verre se trouve associée (Huyghens) une autre lentille plan convexe, à convexité tournée également par en bas, dite verre de champ, parce qu'un de ses effets est d'agrandir le champ du microscope. Entre le verre frontal et le verre de champ existe un diaphragme, destiné à arrêter les rayons qui ont traversé les bords du verre de champ. L'ensemble est réuni en un cylindre de facile introduction dans le tube. Ainsi que nous le verrons, les oculaires concourent dans une grande mesure à la production du grossissement. Ils forment des séries uniformément désignées, par les différents fabricants français et étrangers, par les numéros I, II, III, IV, etc..., le numéro I correspondant aux oculaires les plus faibles. Les oculaires I et III suffisent en pratique.

L'*objectif* est formé, lui aussi, de plusieurs lentilles qui ne doivent pas être séparées les unes des autres. Il est démontré que l'assemblage de plusieurs lentilles donne une aberration de sphéricité moindre qu'une lentille unique ayant la même distance focale. Le grossissement de l'objet examiné et surtout la netteté de l'image dépendent essentiellement de l'objectif. Aussi celui-ci constitue-t-il la partie la plus importante du microscope. Il existe deux sortes d'objectifs. Les uns sont dits à sec, parce que les rayons lumineux sont alors obligés de traverser la couche d'air intermédiaire au couvre-objet et à la

lentille. Dans les autres, dits à immersion homogène, on interpose entre la lamelle et l'objectif une huile spéciale (les objectifs à immersion à eau sont bien délaissés aujourd'hui) dont l'indice de réfraction est aussi voisin que possible de celui du verre qui constitue les lentilles. Les objectifs forment, comme les oculaires, des séries graduées allant des plus faibles aux plus forts, mais, contrairement à eux, ils sont désignés de façon diverse par les fabricants. Reichert, Leitz et les constructeurs français comprennent leurs objectifs entre les chiffres 1 et 9, 1 correspondant aux plus faibles. Zeiss classe les siens entre A et F, F correspondant aux plus forts. Une base rationnelle d'appellation est la distance focale. Elle est employée par tous les fabricants pour distinguer les objectifs à immersion. On peut se contenter pratiquement de posséder les objectifs 2, 4, 7 à sec, et 1/12 à immersion homogène.

Que les objectifs soient à sec ou à immersion, on est en droit d'exiger d'eux certaines qualités que Goring désigne sous les noms de pouvoirs définissant, pénétrant et résolvant. Le pouvoir définissant est la propriété qu'ont les bons objectifs de donner des images à bords bien accentués. Le pouvoir pénétrant permet de révéler avec netteté les parties de l'objet qui sont légèrement en dehors du foyer. Enfin, le pouvoir résolvant, un peu antagoniste des deux précédents, précisera l'image de détails délicats (stries, saillies, dépressions..., etc.). Pour vérifier ces différents pouvoirs, on se sert de test-objets. Ce sont des préparations faites à l'aide de végétaux ou d'animaux microscopiques qui présentent des détails de structure très délicats mais pourtant bien définis. Il nous suffira de citer comme test-objets fréquemment employés : la grammatophora subtilissima, le pleurosigma angulatum et la surirella gemina, appartenant

au groupe des diatomées. Ajoutons que les objectifs à sec servent surtout en histologie et pour l'examen des microbes à l'état frais. Encore qu'on puisse fort bien étudier ces derniers avec l'objectif à immersion, celui-ci est ordinairement réservé à l'examen des préparations colorées. Les objectifs à sec sont susceptibles de rendre aussi des services pour l'étude des parasites de dimensions relativement volumineuses, tels que les protozoaires ou les moisissures. Ils permettent enfin de déceler dans certaines préparations des groupes microbiens volumineux, par exemple, dans des coupes de rate typhique, des amas de bacilles d'Eberth.

II. *Grossissement.*

Le *grossissement d'un microscope*, ou rapport qui existe entre la grandeur de l'image et celle de l'objet, est fonction :

1° De l'objectif.

2° De l'oculaire.

3° De la distance qui sépare l'oculaire de l'objectif.

Un premier moyen de grossir les objets consiste donc à tirer au maximum le tube du microscope. Le procédé est très défectueux, car en même temps l'image devient diffuse et on a calculé que lorsque la longueur du tube dépasse 25 centimètres et que celle de l'oculaire employé n'atteint pas 3 centimètres, la perte de lumière devient telle qu'il est préférable d'en revenir à un grossissement moindre.

Le grossissement est dû en grande partie — en majeure partie, peut-on dire — à l'oculaire, qui joue le rôle de loupe. Mais tout démontre que la perte de lumière occasionnée par l'emploi des oculaires puissants est, à grossissement égal, beaucoup plus

nuisible que celle qui résulte de l'emploi de forts objectifs. Pratiquement, c'est donc aux objectifs qu'on doit recourir lorsqu'on a besoin d'un pouvoir amplifiant élevé. Il est bon de savoir calculer le grossissement d'un appareil donné. On y arrive à l'aide soit de la « chambre claire », soit de l' « oculaire micrométrique », moyennant des calculs fort simples mais qui ne sauraient trouver place ici. Le micromètre oculaire sert de même à la mesure des objets microscopiques.

III. *Maniement du microscope et mise au point.*

Le microscope est installé d'aplomb sur une table solide, afin d'éviter les trépidations. Avant de placer l'objet sur la platine, il faut s'occuper de l'éclairage. Le miroir est incliné dans différentes directions jusqu'à ce qu'on projette par l'orifice de la platine une lumière suffisante pour que l'œil, placé sur l'oculaire, voie le champ du microscope bien éclairé. Il faut éviter de faire pénétrer directement dans l'appareil les rayons solaires, qui fourniraient un éclairage trop éblouissant. Un ciel bleu n'est pas non plus très propice aux observations microscopiques. La meilleure lumière est celle que donnent les nuages blancs élevés. Les nuages gris en donnent souvent si peu qu'il est nécessaire de recourir à une source artificielle. Une bonne lampe à gaz ou à pétrole produit un éclairage suffisant, mais il est préférable de s'adresser aux brûleurs construits par la Société de l'albocarbone, brûleurs dans lesquels le gaz traverse un réservoir contenant de la naphtaline. La flamme qu'ils donnent est fixe et d'un beau blanc. Elle fatigue beaucoup moins que celle du gaz ordinaire. Nous recommandons cependant par dessus tout le bec Auer, qui chauffe beaucoup moins et brille aussitôt allumé,

tandis que le brûleur à albocarbone exige quelque temps avant de bien éclairer et dégage beaucoup de chaleur. Les lampes électriques demeurent inférieures au bec Auer.

L'interposition d'un écran entre la source de lumière et le microscope est très utile pour mieux faire valoir l'éclairage, en le localisant à la préparation examinée. Si celle-ci doit être étudiée avec un objectif à sec, on fera usage du miroir concave. Si au contraire on doit utiliser l'objectif à immersion, c'est au miroir plan qu'on aura recours et on aura soin d'interposer le condensateur Abbé entre ce miroir et la platine. Dans certains cas, que l'examen se fasse à sec ou à immersion, il est bon de placer sous la platine un diaphragme destiné à rendre les images plus nettes en éliminant les rayons marginaux réfléchis par le miroir. Plus l'objectif employé sera puissant et plus l'ouverture du diaphragme doit être réduite. Le diaphragme joue surtout un rôle important quand on se sert de l'appareil Abbé et qu'on examine des « formes ». Si l'on veut seulement observer des « couleurs », par exemple des bactéries fortement teintées, on peut laisser la lumière agir librement (Koch).

Lorsqu'on est en possession d'un bon éclairage, la préparation, fixée sur le porte-objet et, suivant le cas, recouverte ou non d'une lamelle, est placée sur la platine. On dépose au-dessus une goutte d'huile de cèdre, quand l'examen doit se faire à immersion, et on procède à la mise au point. Dans les recherches où l'on se sert de systèmes puissants, il est de règle qu'on doit commencer par l'emploi d'objectifs et d'oculaires faibles. En effet, avec un grossissement modéré, toute l'étendue de la préparation est vite parcourue. Il est facile alors de placer au centre du champ du microscope les points qui paraissent le

plus intéressants. On fixe le porte-objet avec des valets et on examine, en se servant d'objectifs de plus en plus puissants. La mise au point s'exécute, avons-nous dit, par deux mouvements, l'un plus rapide avec l'aide de la crémaillère, l'autre plus lent avec la vis micrométrique. A l'aide du premier mouvement, le tube est descendu dans la douille jusqu'à ce que la lentille arrive à 1 millimètre environ de la préparation si l'examen a lieu à sec, au contact de l'huile de cèdre si on examine à immersion. Il va sans dire que nous n'avons en vue ici que les examens bactériologiques. On sait en histologie que le niveau auquel il faut faire descendre l'objectif est d'autant moins élevé que son numéro est plus fort et la première chose que doit faire un débutant c'est de s'habituer à connaître approximativement ce niveau pour chaque objectif. Lorsque l'objectif a été rapproché de la préparation, on regarde à l'intérieur du tube et on continue à faire descendre celui-ci jusqu'à ce que, sur le champ optique, apparaisse quelque chose, fût-ce une image tout à fait confuse; à ce moment, la vis micrométrique doit entrer en jeu. Il suffit d'une faible rotation pour que l'image se montre avec netteté. Quand la mise au point est réalisée, on ne doit pas cesser de tenir la main droite sur le pignon qui fait manœuvrer la vis micrométrique. L'inobservation de cette règle trahit d'emblée un observateur novice. Si mince que soit une préparation, elle présente toujours plusieurs plans superposés et il faut faire mouvoir presque continuellement la vis — de quantités très petites il est vrai — pour l'étudier dans toute son épaisseur. Lorsqu'à la suite d'un mouvement longtemps prolongé dans le même sens, la vis micrométrique arrive à la fin de sa course, il suffit, pour pouvoir continuer l'examen, de lui faire faire quelques tours en sens inverse. On évitera avec le plus grand soin d'impri-

mer à la vis des mouvements étendus. C'est un instrument très délicat, qu'un usage intempestif aurait vite mis hors d'usage. Pendant l'examen de la préparation, la main gauche ne doit pas rester inactive. Elle saisit le porte-objet ou les boutons qui actionnent la platine mobile, et les manœuvre méthodiquement, de manière à amener sous les yeux de l'observateur les différents points de la préparation. Il va sans dire que plus l'objectif employé est puissant et plus la mise au point exige de précautions. Faute d'une très grande délicatesse dans le maniement de la vis micrométrique, le liquide de montage reflue de chaque côté de la lamelle et le couvre-objet peut se briser sous la pression de la lentille qui, elle-même, court le risque d'être sérieusement endommagée. Nous verrons plus tard qu'un grand nombre de préparations bactériologiques peuvent être effectuées sans couvre-objet. La mise au point se trouve alors un peu simplifiée. La brusquerie est cependant toujours à éviter, car elle est susceptible de nuire, répétons-le, à la fois à la lentille et à la préparation.

L'examen terminé, on doit relever légèrement le tube avant d'enlever la lame. Sans cette précaution, on risquerait de rayer l'objectif et de le souiller avec le liquide qui a servi à monter la préparation ; celle-ci pourrait être également endommagée.

IV. *Soins à donner au microscope.*

Un bon microscope doit être entretenu avec une véritable sollicitude, qui s'étendra à toutes ses parties constituantes.

Les lentilles de l'oculaire, les deux faces du miroir, le condensateur Abbé, doivent, avant et après chaque examen, être débarrassés de la poussière qui a pu se

déposer à leur surface à l'aide d'une pièce de toile très fine ou mieux d'un morceau de mousseline.

L'objectif doit être nettoyé de façon analogue. On le prend dans la main gauche, on coiffe d'une mousseline l'index de la main droite et on nettoie doucement à l'aide d'un mouvement tournant très léger, de façon à ne pas rayer la lentille. Il faut apporter la plus grande attention à ce que les objectifs à sec ne soient souillés ni d'huile de cèdre, ni de baume de Canada. Si cet accident venait à se produire, on verserait sur une pièce de mousseline deux ou trois gouttes de xylol ou de toluène et on y dissoudrait l'huile ou le baume, en frottant légèrement. On évitera toutefois d'employer un excès de xylol, de peur que ce liquide, venant à pénétrer dans l'objectif, ne dissolve le vernis qui sert à souder les verres dont est formée la lentille. On ne démontera jamais soi-même les différentes pièces dont se compose l'objectif. S'il vient à se troubler, et que le nettoyage de la lentille extérieure ne suffise pas à lui rendre sa clarté, il sera adressé au constructeur.

Un soin tout particulier doit être pris des objectifs à immersion qui, après chaque séance, seront débarrassés de l'huile adhérente avec une mousseline sèche d'abord, puis imbibée d'une goutte de xylol.

Enfin, il va de soi que si des préparations sont examinées dans un liquide corrosif, tel que la potasse ou différents acides, on évitera avec le plus grand soin que ces réactifs ne viennent au contact de la lentille. On se gardera aussi d'examiner avec un fort grossissement une préparation chauffée.

La partie mécanique du microscope ne doit pas non plus être négligée. La platine sera souvent nettoyée et soigneusement préservée du contact d'un porte-objet dont la face inférieure serait humide. Un peu de xylol la débarrassera de l'huile

de cèdre ou du baume qui l'auraient souillée le cas échéant.

Il arrive qu'après un usage un peu prolongé le glissement du tube dans le canon (ou tube extérieur) s'opère avec difficulté. On enlèvera le tube, on l'essuiera avec un linge sec de façon à le débarrasser d'une sorte d'enduit noirâtre qui le recouvre, puis on le frottera légèrement avec un peu d'huile ou de vaseline et on l'essuiera encore avec un linge sec. La face interne du canon sera nettoyée, elle aussi, de semblable façon.

A la suite d'un examen un peu prolongé, il se condense toujours sur le corps du microscope un peu de buée provenant de la respiration ; cette buée apparaît de même lorsque l'appareil est porté d'une pièce froide dans une autre plus chaude. Après chaque examen on aura donc soin d'essuyer son microscope avec un linge sec ou une peau de chamois. Dans l'intervalle des séances, le microscope sera réintégré dans sa boîte ou placé sous une cloche de verre. Afin d'empêcher que les objectifs et les oculaires ne se remplissent de poussières, il est bon — dans certains cas tout au moins — de les enlever chaque fois et de les enfermer dans la boîte spéciale qui leur est destinée. Pour éviter le dépôt de sueur sur l'oculaire, dépôt parfois très gênant, nous conseillons (à l'exemple de ce que font certains laryngologues pour leurs miroirs) d'y mettre une trace d'eau de savon, assez faible pour ne laisser aucun trouble.

L'air marin altère les métaux dont est formé le microscope ; il a aussi une influence très défavorable sur le verre des objectifs et des oculaires et surtout sur celui des lames et des lamelles dont il sera parlé tout à l'heure. Un voile se forme à leur surface et l'examen microscopique est rendu très difficile. Pour combattre la détérioration des parties métalliques on pourra

(comme dans les laboratoires de chimie) faire palladier les objectifs et nickeler le microscope. On pourra aussi, plus simplement, badigeonner de temps en temps objectifs et microscope avec du vernis à métaux, dont le prix est peu élevé. Les lames et les lamelles seront conservées au besoin dans de l'huile de cèdre, les objectifs et oculaires soustraits le mieux possible à l'air marin pendant le temps de repos.

V. *Lames et lamelles.*

On emploie de préférence, pour les examens microscopiques, des lames de verre (porte-objets) du format dit anglais (76 millimètres de long sur 26 millimètres de large). Les lamelles (couvre-objets) de 18/18 (c'est-à-dire de 18 millimètres sur 18) conviennent à presque tous les cas. On pourra néanmoins en posséder quelques boîtes de 16/16, de 22/22 et de 22/32. Les lames et les lamelles usagées sont mises à plonger dans l'acide sulfurique (l'acide dont on se sera servi lors des dessiccations pourra être avantageusement tenu en réserve pour cet emploi). Si elles ont été souillées par de l'huile de cèdre ou du baume de Canada, on les traitera d'abord par le carbonate de soude bouillant à 5/100 environ, puis on les lavera à grande eau ; au sortir de l'acide sulfurique, lames et lamelles seront mises dans de l'alcool à 70° additionné d'ammoniaque, où on les conservera jusqu'au moment du besoin. On conservera de même les lames et lamelles neuves dans l'alcool ammoniacal. Avant l'usage on essuiera les unes et les autres à l'aide d'un linge sec et propre. Le procédé de Zettnow peut être également employé pour nettoyer les porte-objets et couvre-objets sales. Il consiste à les faire bouillir dix minutes dans le mélange oxydant suivant :

Eau.	1	litre.
Bichromate de potasse. . .	200	grammes.
Acide sulfurique. . . .	200	—

On lave ; on trempe pendant 5 minutes dans une lessive de soude étendue ; on lave à nouveau ; on passe encore dans le mélange oxydant ; on lave, on fait agir la soude ; on lave une dernière fois. Finalement, on conserve dans l'alcool (ou mieux, d'après nous, dans l'alcool ammoniacal).

CHAPITRE III

PROCÉDÉS DE STÉRILISATION. — TRANSVASEMENT DES LIQUIDES STÉRILES

I. *Procédés de stérilisation.*

Tout produit destiné à être examiné bactériologiquement doit être recueilli avec pureté, ensemencé sur des milieux privés de germes et inoculé aseptiquement. La stérilisation est donc la base de toute recherche bactériologique. Elle repose sur un certain nombre de principes tout à fait classiques qu'il nous suffira de rappeler en quelques mots. C'est d'abord l'absence de génération spontanée, définitivement démontrée par Pasteur. C'est ensuite la stérilité pratiquement absolue des liquides naturels (leur altération est toujours due à des germes venus du dehors). A cela il faut ajouter que, d'une façon générale, tous les germes sont détruits par une température de 115° (chaleur humide) ou de 180° (chaleur sèche) et que l'air filtré sur de l'ouate est stérile. Ces notions très simples, dont nous allons voir maintenant l'application, n'ont nul besoin d'être développées.

Les méthodes de stérilisation peuvent se ranger sous 4 chefs. Nous étudierons successivement l'emploi :

1° De la *chaleur sèche.*
2° De la *chaleur humide.*
3° De la *filtration.*
4° Des *antiseptiques.*

1° Stérilisation par la chaleur sèche.

On peut la pratiquer des deux façons suivantes :

1° **Stérilisation dans la flamme.** — Lorsqu'il s'agit d'un petit instrument en verre ou en métal (pipette, aiguille, agitateur, scalpel, etc.), on se contente de le passer plusieurs fois dans la flamme d'un bec Bunsen (flamme chauffante), d'une lampe à alcool, ou d'un brûleur à pétrole (flamme bleue), puis on le laisse refroidir, en évitant que l'extrémité dont on veut se servir ne soit souillée par le contact des objets voisins. Si l'on veut ne pas détremper les instruments en acier, il faut avoir soin de les passer simplement dans la flamme et de ne pas les y maintenir, comme on le fait trop souvent. On porte au contraire au rouge un fil de platine sans nul inconvénient. La stérilisation dans la flamme, inefficace du reste pour les objets de grandes dimensions ou pourvus d'anfractuosités, n'est applicable que dans un certain nombre de cas. Mentionnons encore qu'on peut flamber un instrument dans du papier enflammé ; une grosse allumette peut aussi servir à la rigueur à stériliser un bistouri. Enfin, inversement, on peut promener la flamme sur un objet pour le désinfecter.

2° **Stérilisation dans le four à flamber.** — Le four à flamber est un appareil en tôle à double paroi, tantôt cylindrique (four Pasteur) (fig. 43), tantôt parallélipipédique (four Chantemesse) (fig. 44), comme nous l'avons déjà dit. Prenons le premier comme type. Il est muni d'un brûleur à gaz à la partie inférieure, et d'une cheminée latéralement. A sa partie supérieure, il est fermé par un couvercle percé d'un trou dans lequel pénètre un bouchon traversé par le thermomètre. A l'intérieur, on dispose soit des tubes à essai préalablement bouchés avec de

l'ouate, soit des pipettes également munies d'un tampon de coton, soit des verres à expérience recouverts de papier, soit des boîtes de Pétri complètement entourées de papier, etc. L'extrémité qui porte l'ouate ou le papier doit être tournée en haut. Il faut éviter de placer les objets entourés de papier en contact direct

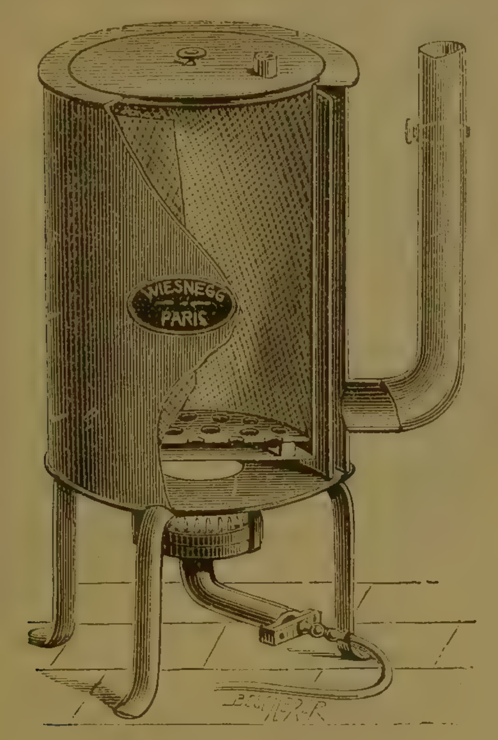


Fig. 43. — Four Pasteur.

avec le fond ou les parois de l'appareil, car la température y est toujours bien plus élevée que dans le reste du four. Pour éviter le contact avec le fond, on peut faire reposer la verrerie sur des briques ou des morceaux de tuile. Nous devons faire remarquer également qu'il est absolument inutile d'envelopper dans du papier à filtre les objets qu'on veut stériliser au

four Pasteur. On réalisera une économie notable en se servant de journaux ou de papier d'emballage. Il va de soi que le coton ordinaire sera employé à l'exclusion de l'ouate hydrophile. — Le four Pasteur étant

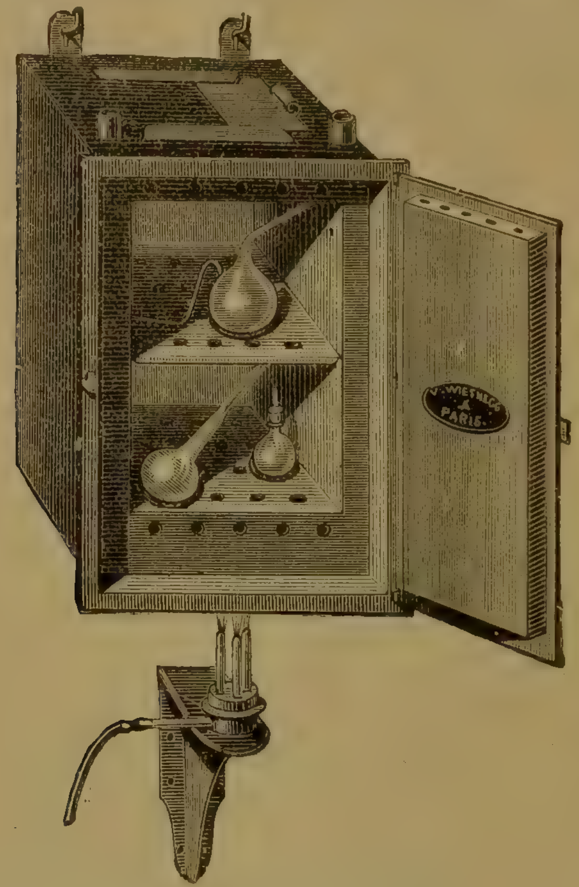


Fig. 44. — Four Chantemesse.

fermé, on allume le gaz. On a soin pour cela de présenter l'allumette devant les becs avant d'ouvrir le robinet. Il faut absolument éviter que ces becs ne brûlent en dedans, ce qui dessouderait leur tige. Lorsque cet accident se manifeste, on en est averti par

la petite explosion qui se produit, par la blancheur de la flamme, par un sifflement spécial et par l'odeur d'acétylène qui se répand dans la pièce. Il faut alors fermer le robinet du gaz, attendre un instant et ne le rouvrir que lorsqu'on a présenté une allumette enflammée au-dessus des brûleurs. On chauffe jusqu'à 180°. Cette température une fois atteinte, on modère la flamme et, après une demi-heure, on éteint. On laisse refroidir au-dessous de 100°, puis on ouvre le four progressivement et on attend quelque temps avant d'enlever les objets. Si on négligeait ces précautions, le verre se briserait. Il se serait également brisé au cours de la stérilisation si, la verrerie introduite n'étant pas parfaitement sèche, on avait chauffé trop rapidement. On reconnaît qu'un flambage est réussi lorsque le coton et le papier ont pris une teinte jaune clair. S'ils sont incolores, la température n'a pas été suffisante. S'ils sont noircis, elle a été excessive. Dans ce dernier cas, les tampons d'ouate torréfiés ne fermeront plus hermétiquement les tubes et les pipettes ; le papier qui recouvre les verres à expériences se brisera lorsqu'on voudra le soulever ; enfin la verrerie sera d'ordinaire souillée par un goudron noirâtre difficile à enlever et antiseptique : tous ces objets sont inutilisables. Si on ne dispose pas d'un thermomètre allant jusqu'à 200°, on peut remplacer, dans le couvercle de l'appareil, le bouchon de liège par un bouchon de coton. On éteindra lorsque ce coton aura pris une teinte café au lait.

Les tubes à essai et les pipettes que l'on se propose de flamber doivent être, cela va sans dire, disposés dans des paniers métalliques.

2° Stérilisation par la chaleur humide.

1° **L'ébullition** se présente tout d'abord à l'esprit,

mais c'est un procédé de *désinfection* plutôt que de *stérilisation*. Il n'est applicable à ce dernier point de vue que dans un nombre de cas fort restreint. Les expériences de Miquel et Lattraye ont démontré en effet qu'il ne fallait pas moins de 5 heures pour stériliser complètement un milieu de culture à 100°. L'ébullition entraîne enfin une dépense de combustible très considérable.

2° **La vapeur d'eau à 100°** est d'un emploi plus fréquent et plus pratique et les *stérilisateurs de Koch* (fig. 45) *et de Budenberg-Wiessnegg* (fig. 46) rendent journellement de grands services. Le premier de ces appareils se compose d'un brûleur à gaz permettant de porter rapidement à l'ébullition l'eau d'une chaudière cylindrique, au-dessus de laquelle s'adapte la chambre de stérilisation, figurée par un second cylindre métallique. Ce cylindre est fermé par un couvercle où l'on a ménagé un orifice pour le passage du thermomètre. La chaudière étant remplie d'eau, on lui adapte la chambre de stérilisation, dans laquelle les objets ont été déposés, et l'on ferme. On allume le brûleur. La vapeur ne tarde pas à s'échapper autour du couvercle. Suivant le but qu'on se propose, on prolonge l'opération pendant une demi-heure ou pendant plusieurs heures et on éteint. L'*appareil Budenberg-Wiessnegg* est aussi très employé. Il se compose d'une vasque surmontée d'un cylindre qui repose sur elle par quatre pieds. Ce cylindre contient un panier et peut être coiffé d'un autre cylindre plus grand, formant manteau et pourvu d'un orifice à sa partie supérieure. Sous la vasque est suspendu un disque mince communiquant au centre par un gros tube avec l'intérieur du cylindre et à la périphérie par quatre petits tubes avec la vasque elle-même. L'appareil est soutenu au-dessus d'un brûleur par un manchon de tôle L'eau, versée dans la vasque, tombe dans le disque et se réduit rapidement en vapeur.

La vapeur gagne le cylindre intérieur. Une partie s'échappe ; l'autre redescend entre les deux cylindres,

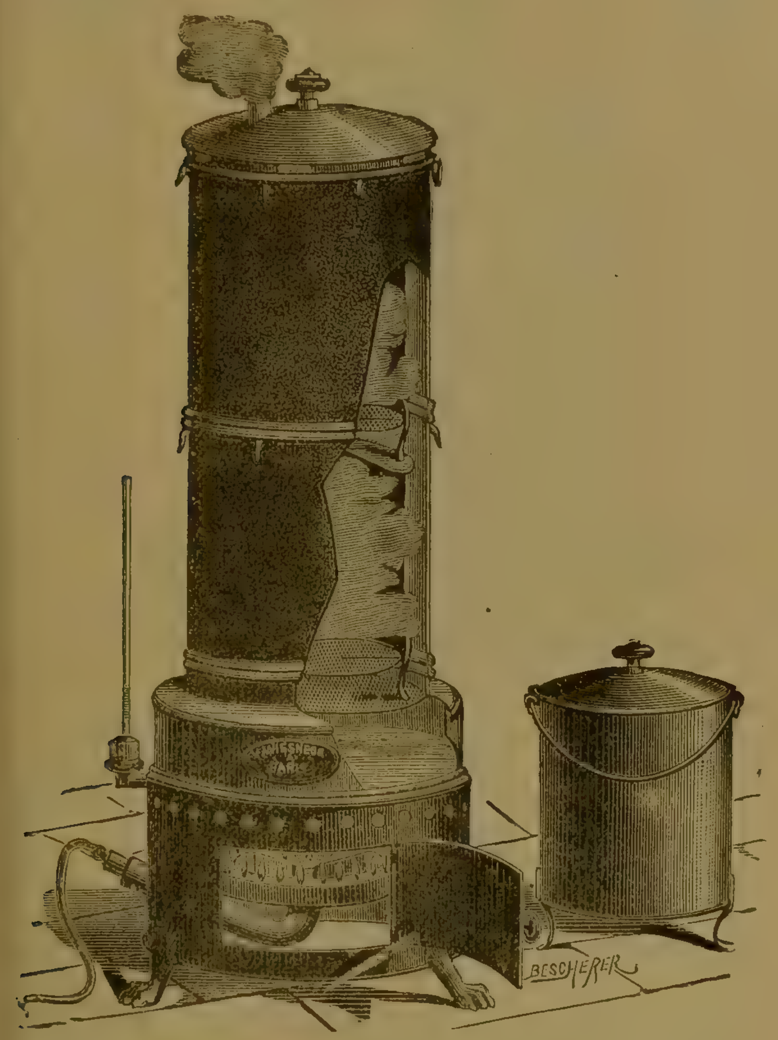


Fig. 45. — Stérilisateur de Koch.

se condense et retombe dans la vasque. Il est bon toutefois de donner la préférence aux appareils munis d'un niveau constant, qu'on n'est pas obligé de

surveiller comme les autres pour remplacer l'eau évaporée.

On pourrait utiliser également pour la stérilisation

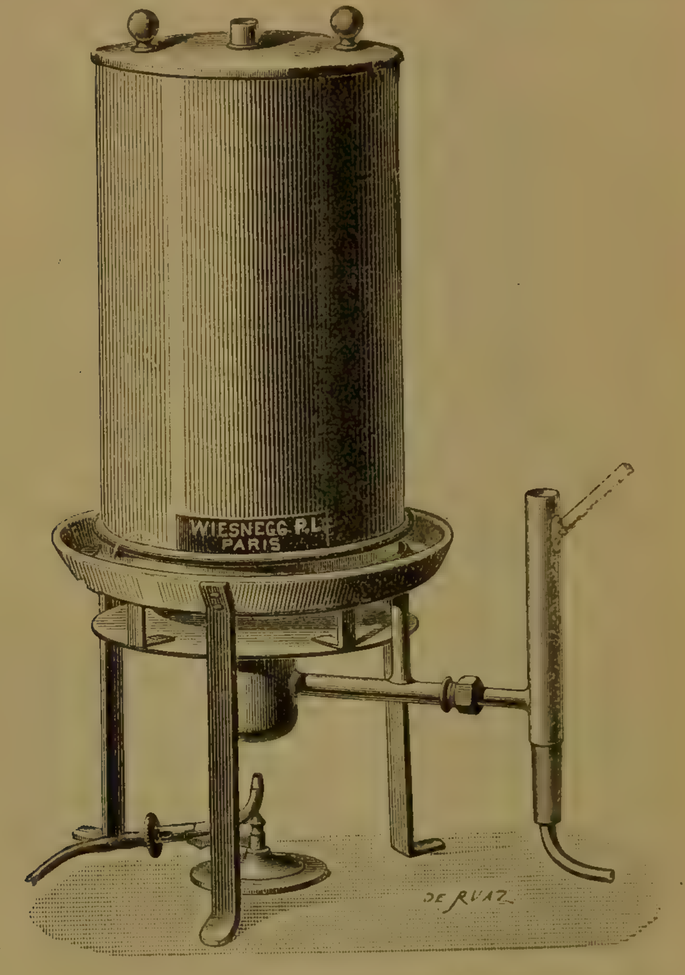


Fig. 46. — Stérilisateur de Wiesnegg, à niveau constant.

par la vapeur d'eau à 100° l'autoclave Chamberland. Il suffirait, comme nous le verrons, de laisser ouvert le robinet de l'appareil.

Le principal avantage de la vapeur d'eau à 100° est la rapidité avec laquelle on obtient une stérilisation suffisante dans un grand nombre de circonstances. Lorsqu'on a besoin d'une stérilisation parfaite, on est obligé de répéter le chauffage 3 jours de suite en le prolongeant chaque fois un certain temps. C'est un sérieux inconvénient. Mieux vaut alors le plus souvent recourir à la vapeur d'eau sous pression.

3° **La stérilisation par la vapeur d'eau sous pression** se pratique presque toujours à l'aide de l'*autoclave Chamberland* (fig. 47). C'est une marmite cylindrique en cuivre, susceptible d'être fermée hermétiquement par un couvercle massif reposant sur une rondelle de caoutchouc et maintenu par des boulons. Cette marmite est supportée par un cylindre de tôle qui loge à sa partie inférieure deux rampes à gaz concentriques, indépendantes l'une de l'autre. Elle renferme un panier métallique destiné à recevoir les objets à stériliser. Le couvercle est muni d'un robinet pour l'échappement de la vapeur, d'une soupape de sûreté et d'un manomètre donnant la pression et, en fonction de cette pression, la température.

On commence par verser de l'eau dans la marmite presque jusqu'à l'affleurement de la paroi inférieure du panier. Dans ce panier, on dispose les tubes ou les vases à culture, fermés comme toujours avec de l'ouate ou d'autres objets entourés de papier, puis on place le couvercle, en mettant le o qu'il porte sur sa circonférence en regard de celui qui se lit sur le rebord supérieur de la marmite. On serre les vis à la main plutôt qu'à la clef (trop brutale) en tournant à la fois deux écrous situés aux extrémités d'un même diamètre. On allume alors, comme il a été indiqué pour le four à flamber. Au bout d'un temps variable selon le volume de l'autoclave, le robinet ouvert laisse passer la vapeur, en jet d'abord intermittent puis continu.

Lorsque ce jet s'échappe de façon continue et avec

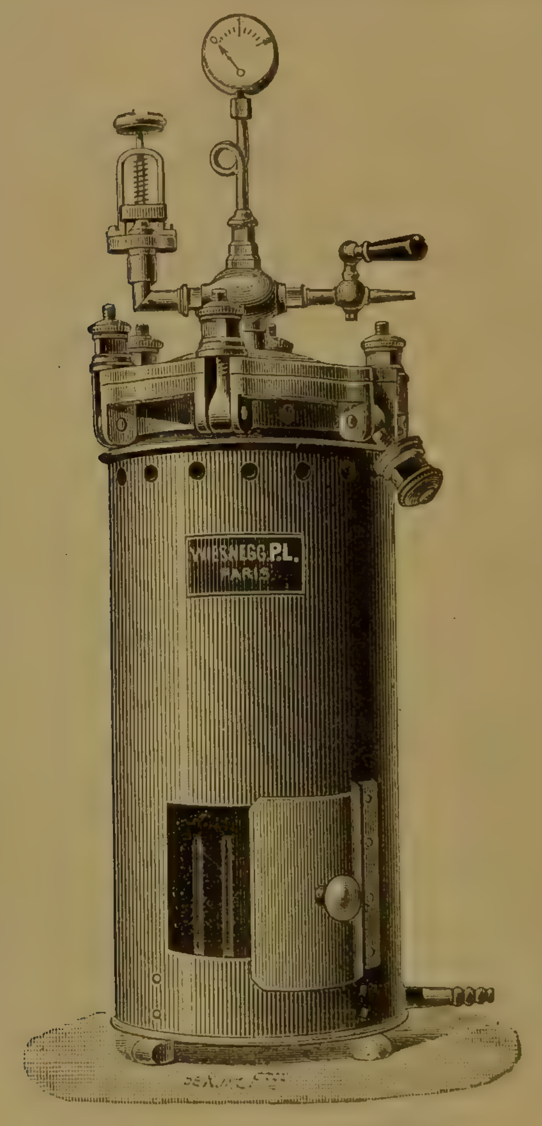


Fig. 47. — Autoclave Chamberland.

force, on ferme le robinet. Si l'on fermait trop tôt, c'est-à-dire lorsque la vapeur sort avec intermittence,

on emprisonnerait dans l'autoclave une certaine quantité d'air, dont le mélange avec la vapeur d'eau produirait une pression supérieure à celle de cette dernière seule. Comme, à l'aide du manomètre, on apprécie la température en fonction de la pression, on aurait une indication trop élevée et la stérilisation serait illusoire. Dès que le robinet est fermé, l'aiguille du manomètre se déplace vers la droite; on la suit des yeux. Lorsqu'elle indique 115° ou 120°, suivant le cas, on éteint l'une des couronnes de gaz; on modère la flamme de la seconde et on attend dix minutes, un quart d'heure ou davantage, on éteint, on surveille à nouveau l'aiguille du manomètre, qui redescend vers la gauche et on laisse tomber à 100°. A ce moment seulement on ouvre le robinet. Si on ouvrait plus tôt, les liquides brusquement décomprimés entreraient en ébullition et sortiraient des vases de culture, ou tout au moins ils expulseraient les tampons de coton. La stérilisation terminée, on enlève le couvercle, en dévissant les écrous avec la clef et on retire les objets, qu'on a bien soin de ne pas déposer sur un corps trop froid. Si, pour retirer ces objets, on attendait jusqu'à complet refroidissement de l'appareil, la rondelle de caoutchouc qui rend la fermeture hermétique adhérerait au couvercle et serait détériorée quand on ferait effort pour l'enlever. Dans l'intervalle des stérilisations, cette rondelle ne doit pas être laissée sous le couvercle mais suspendue à un des boulons; on évite ainsi de l'aplatir, ce qui exposerait à des fuites de vapeur. Une fois par semaine au moins, l'intérieur de la marmite doit être nettoyé à fond.

Ainsi constitué, l'autoclave peut remplacer un grand nombre des appareils usités en bactériologie. Il permet de stériliser à la fois par la vapeur d'eau sous pression et à 100° (robinet ouvert pendant toute la durée de l'opération). Il peut être muni d'un régulateur de Roux

et servir d'étuve ou de bain-marie. Il peut enfin remplacer le four à flamber pour la stérilisation de la verrerie. Il suffit alors de mettre un peu d'eau dans les vases qu'on y introduit. L'autoclave peut lui-même être suppléé lorsqu'on a à stériliser des quantités considérables d'objets (services sérothérapiques par exemple), qu'on se trouve sur un navire, ou qu'on opère en temps d'épidémie, etc., par les grandes étuves qui utilisent la vapeur d'eau sous pression et dont les modèles les plus usités sont ceux de Vaillard et Besson et de Geneste-Hescher.

Remarquons encore que les objets qui ne peuvent être obturés à l'ouate doivent être déposés, dans les autoclaves ou les stérilisateurs, entourés de papier. On peut, à cet effet, employer le plus souvent du papier ordinaire. Lorsqu'on aura recours au papier filtre, on choisira le papier gris, plus économique que le blanc. Pour protéger les appareils et les milieux contre l'eau de condensation, on surmontera les ballons d'un capuchon de papier et l'on recouvrira les paniers qui contiennent les tubes à essai de papier ou d'une compresse. Les tampons de coton, situés à l'extrémité des tubes de verre que comportent divers appareils, seront également protégés à l'aide de cornets de papier. Dans les laboratoires, les stérilisations à l'autoclave sont d'ordinaire confiées à des garçons ; il est donc bon de pouvoir les contrôler. On se servira, comme indicateurs, de divers corps, fusibles à des températures déterminées et contenus dans des ampoules de verre scellées. Certains auteurs ont préconisé les alliages métalliques, d'autres la pyrocatéchine, etc. Le plus simple de tous est le soufre en poudre qui fond aux environs de 115°. Pour savoir si la *durée* de la stérilisation a été suffisante, on peut augmenter la masse du corps, l'épaisseur de l'enveloppe ou encore recou-

rir à deux enveloppes séparées par une couche d'air.

4° **Chauffage discontinu.** — La stérilisation par les hautes températures et même à 100° n'est pas applicable à tous les cas. Certains produits, les sérums en particulier, s'altèrent lorsqu'ils sont chauffés au delà de 60°. On est alors obligé de recourir, soit à la filtration (ubi infra), soit à la stérilisation discontinue ou méthode de Tyndall. La théorie proposée par cet auteur est la suivante : la température de 58°, insuffisante pour coaguler le sérum (la stérilisation du sérum peut être prise comme type le plus fréquent), suffit par contre à tuer les microbes qui s'y trouvent à l'état mycélien. Elle n'a aucune prise sur les spores. Entre chaque chauffage, celles-ci se développent et donnent naissance à des bactéries filamenteuses, que détruit l'opération suivante. On est plutôt d'avis aujourd'hui que le chauffage discontinu agit en hydratant progressivement les spores, qui finissent par se comporter au point de vue de la coagulabilité de leur protoplasma comme des bactéries mycéliennes. Pour opérer la stérilisation discontinue (du sérum, par exemple) on aura recours avec avantage au bain-marie spécialement construit à cet effet par Wiessnegg (fig. 48). Un brûleur à gaz permet d'élever la température d'un cylindre de cuivre muni d'un régulateur de Roux. La température est donnée par un thermomètre qui traverse le couvercle de l'appareil. Le cylindre est rempli d'eau. Un panier en toile métallique, cloisonné et muni d'un couvercle, permet d'y maintenir immergés les ballons (scellés) qui contiennent le liquide à stériliser. Le couvercle étant mis, on allume le gaz ; on règle l'appareil pour la température désirée (58° s'il s'agit de la stérilisation du sérum). Lorsque cette température a été prolongée pendant une heure, on éteint l'appareil. Les ballons y demeurent dans

l'intervalle de deux opérations consécutives. Le lendemain on rallume le brûleur qui cette fois se règle automatiquement, et ainsi de suite pendant six jours. On peut fort bien, pour ces chauffages discontinus, se passer d'un appareil spécial. Un bain-marie quel-

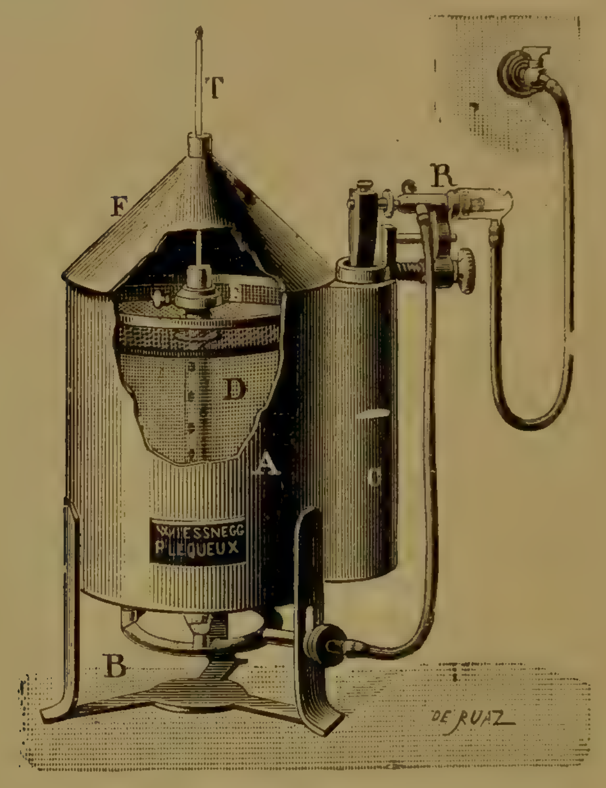


Fig. 48. — Bain-marie pour stériliser le sérum.

conque, improvisé par exemple avec la marmite de l'autoclave et le régulateur de Roux, suffit amplement. Avant d'employer les milieux nutritifs stérilisés par la méthode discontinue, il est prudent de les laisser séjourner 48 heures au moins dans l'étuve à 37°. On s'assure ainsi que la stérilisation a été efficace. A côté de la stérilisation du sérum, nous devons citer, parmi

les applications de la méthode de Tyndall, le chauffage discontinu de la gélatine, tel qu'il se pratique dans la préparation de ce milieu nutritif par le procédé de M. Roux; mais ici on porte la température jusqu'à 100° et on emploie communément l'autoclave (*ubi infra*).

3° Stérilisation par filtration.

1° **Bougies filtrantes.** — Les mêmes raisons qui motivent l'emploi du chauffage discontinu font recourir à la stérilisation par filtration. La filtration permet en effet de stériliser des liquides dont la chaleur altérerait la constitution. Certaines diastases, l'abrine..., sont même détruites à une température inférieure à celle qui tue les bactéries mycéliennes. Le rôle de la filtration ne se borne pas là. Indépendamment de sa grande importance hygiénique dans la purification de l'eau de boisson, la filtration est encore employée pour la préparation des toxines et inversement, dans certains cas plus rares, pour collecter sur le filtre une grande masse de micro-organismes. Elle permet même d'isoler certains microbes, tels que ceux de la fièvre aphteuse, de la péripneumonie et de la horse-sickness, assez petits pour traverser les bougies. Les appareils les plus anciennement usités furent les filtres de plâtre de Pasteur et Joubert, de Miquel, etc. Ils sont d'une fabrication très laborieuse et d'un rendement insuffisant. Aussi ont-ils été absolument abandonnés pour la bougie Chamberland qui représente le type de tous les appareils filtrants (fig. 49). Elle est constituée par un cylindre creux en porcelaine dégourdie, fermé à l'une de ses extrémités et muni à l'autre d'une embase vernissée avec tétine qui permet d'y adapter un tube de verre ou de caoutchouc. Il existe deux types de bougies, le modèle B plus dur et le

modèle F plus perméable. On construit aussi des petits cylindres de laboratoire, le plus souvent sans tête. Avant de se servir de la bougie Chamberland, il est indispensable de s'assurer qu'elle ne présente aucune solution de continuité. Pour cela, il ne suffit pas de l'examiner avec le plus grand soin, car les fissures

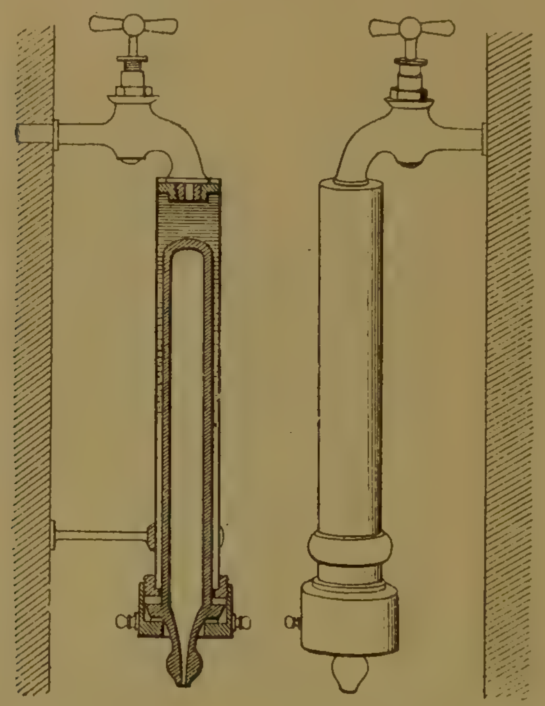


Fig. 49. — Filtre Chamberland.

peuvent être imperceptibles à l'œil nu. Il faut plonger la bougie, son extrémité fermée en bas, dans une éprouvette remplie d'eau, relier la tetine à une poire de Richardson ou à une petite pompe à main et insuffler de l'air. S'il se produit des bulles, la bougie est fêlée et doit être rejetée, sous peine d'avoir une filtration tout à fait illusoire. Si elle est bonne, il faut la stériliser en la portant à l'autoclave (20 mi-

nutes à 120°). Lorsqu'il s'agit d'une bougie qui débite de l'eau stérile, on la nettoiera tous les deux jours environ, en brossant sa surface externe sous un courant d'eau. Toutes les semaines, on la stérilisera à nouveau. Enfin, lorsqu'elle commencera à s'encrasser, ce qu'on reconnaîtra à la diminution du débit, il faudra, suivant l'expression courante, la régénérer. Même nécessité pour les bougies qui ont servi à la stérilisation des milieux, à la préparation des toxines, etc. Il existe, pour régénérer les filtres, un grand nombre de procédés. Un des meilleurs consiste à les porter au rouge dans la flamme du chalumeau ou mieux dans un four à moufle. Il importe toutefois de ne soumettre à la chaleur que des bougies tout à fait exemptes d'humidité.

D'autres filtres que celui de M. Chamberland peuvent être utilisés. Telles sont les bougies d'alumine, pour filtration sous pression d'acide carbonique (d'Arsonval) et surtout les bougies en terre d'infusoires (bougies Berkefeld). Les avantages que la bougie Chamberland présente sur la bougie Berkefeld sont de coûter moins cher, d'être moins fragile, d'être inusable, de pouvoir être régénérée par la chaleur et enfin d'être homogène, alors que la bougie Berkefeld possède une tête en porcelaine ou en métal collée au cylindre poreux à l'aide de ciment. Inversement, la bougie Berkefeld offre l'avantage d'une filtration très rapide, condition précieuse lorsqu'on a affaire à des liquides albumineux tels que le sérum. Elle altère aussi très peu les enzymes et les diastases. On la régénère en la brossant et en y faisant passer ensuite une solution de carbonate de soude ou de l'eau ammoniacale. Nous mentionnerons toutefois que le brossage ne va pas sans une usure notable de la bougie, usure dont il faut surveiller le progrès avec soin. La bougie Berkefeld se laisse traverser par les microbes de la horse-sickness,

de la fièvre aphteuse et de la péripneumonie. Ces deux derniers seuls traversent la bougie Chamberland modèle F, mais non modèle B.

2° **Appareils à filtrer.** — Les bougies Chamberland ou Berkefeld entrent dans la constitution d'appareils de filtration très divers, que nous allons maintenant décrire. Tous les dispositifs usités peuvent se répartir en deux classes, suivant que la filtration s'y opère par pression ou par aspiration. Dans le premier cas, on utilise la bougie Chamberland B, dans le second, la bougie F.

1° Filtration par aspiration. — *Un des appareils les plus simples est dû à M. Chamberland.* Il se compose d'un matras-pipette à 3 tubulures, l'une médiane et les autres latérales. La tubulure médiane est mise en relation avec la bougie à l'aide d'un tube en caoutchouc (caoutchouc Martin). Des deux tubulures latérales, l'une, ouverte et munie d'un tampon de coton, sera reliée à la pompe d'un aspirateur Potain ; l'autre, effilée et fermée, servira à distribuer le liquide filtré. On opère de la façon suivante : on stérilise ensemble à l'autoclave (20 minutes à 120°) le matras, dans lequel on a versé au préalable quelques gouttes d'eau, la bougie bien humectée et le tube de caoutchouc qui les fait communiquer. Puis on verse le liquide à filtrer dans une éprouvette de dimensions convenables ; on y plonge la bougie ; on relie le matras à l'aspirateur et on fait le vide. Le liquide s'écoule dans le matras et on le distribue ensuite dans des vases stériles.

Très simple aussi et très employée, est la *carafe à filtrer, dite de Kitasato.* Elle se compose d'un flacon cylindro-conique à parois épaisses, muni d'un large goulot et d'une tubulure latérale destinée à être mise en communication avec un appareil aspirateur. Une bougie, de petites dimensions et sans tête, est engagée, la partie ouverte en haut, dans un bouchon de caoutchouc

conique, qui sert d'autre part à maintenir l'entonnoir terminant en haut l'appareil. Ce bouchon s'adapte dans un autre, plus large, comme le montre la figure. Enfin, notons que la plus grande partie de la bougie plonge, naturellement, dans le flacon. Lorsqu'on veut se servir de l'appareil ainsi monté, on entoure l'entonnoir de plusieurs doubles de papier et on place un tampon d'ouate à l'orifice de la tubulure latérale. On porte à l'autoclave (120°). L'appareil étant refroidi, on enlève le papier ; on verse le liquide à filtrer dans l'entonnoir et on met la tubulure en communication avec l'appareil aspirateur (trompe à eau par exemple). Le vide se faisant, le liquide traverse la bougie et vient tomber dans le flacon, d'où il n'y a plus qu'à le transvaser aseptiquement. L'appareil de Kitasato (fig. 50) ne diffère en rien de l'ancien appareil de M. Duclaux.

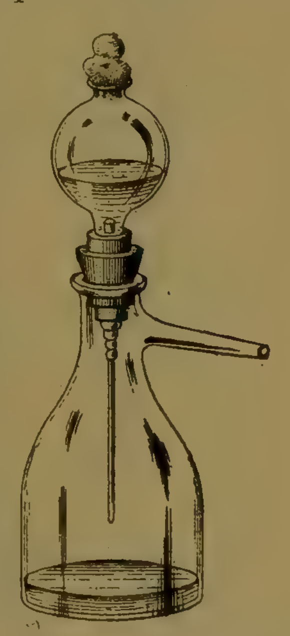


Fig. 50. — Carafe à filtrer de Kitasato.

L'appareil à filtration de Martin (fig. 51) présente cet avantage que sa disposition permet de pratiquer une filtration continue et de manier, sans le moindre danger, les liquides les plus riches en microbes. La bougie Chamberland est contenue dans un cylindre métallique à la partie supérieure duquel peut se visser un entonnoir muni d'un robinet. La partie inférieure du cylindre, susceptible d'être isolée, présente un orifice pour le passage de la tetine ; cette partie se visse sur le reste et une rondelle de caoutchouc perforée, moulée sur l'embase de la bougie, empêche tout suintement

de liquide lorsque le cylindre est rempli. La tetine de la bougie communique par un tube en caoutchouc spécial, dit caoutchouc Martin (moins épais et plus facile à manier que le caoutchouc à vide ordinaire) avec la tubulure inférieure d'un ballon en verre résistant. Ce

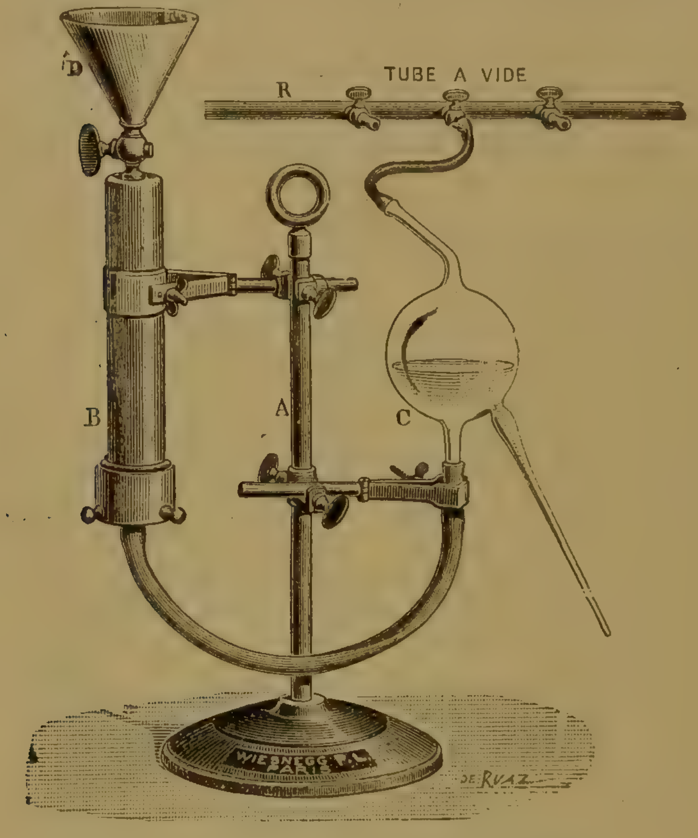


Fig. 51. — Appareil à filtration de Martin.

ballon porte en haut une seconde tubulure, permettant de le mettre en rapport avec une trompe à eau et en bas une effilure, servant à répartir aseptiquement le liquide filtré. L'ensemble de l'appareil est fixé sur un support métallique. Lorsqu'on veut se servir du filtre, on commence par stériliser d'une seule pièce

à l'autoclave la partie inférieure du cylindre métallique, la bougie (humide), le tube de caoutchouc et le ballon (contenant un peu d'eau). La tubulure qui communique avec la trompe a été munie d'un tampon de coton et le tube effilé fermé à la lampe. La bougie, une fois stérilisée, est introduite dans le cylindre métallique, en plaçant la rondelle de caoutchouc et en vissant la partie inférieure au reste de l'armature. Cylindre et ballon sont ensuite fixés au support et la communication est établie avec la trompe. Le produit à filtrer est versé dans l'entonnoir, dont le robinet reste ouvert. On pratique le vide ; la différence de pression fait descendre continuellement le liquide dans la gaine, d'où il traverse l'épaisseur et la cavtié centrale de la bougie, pour se rendre finalement dans le ballon.

Lorsque, pour une cause ou une autre, une filtration s'annonce comme trop lente, on fait ordinairement le vide le soir (à la trompe ou avec une pompe à main) et on laisse l'opération se terminer pendant la nuit. Il va de soi que si on se sert de la trompe on ne laissera pas s'écouler l'eau durant tout ce temps.

2° Filtration par pression. — La filtration par pression présente sur la filtration par aspiration l'avantage d'une grande rapidité. Les appareils qui la mettent en œuvre sont malheureusement d'une certaine complication et d'un volume plus considérable, partant d'un prix de revient plus élevé que les précédents. Le plus employé est l'appareil Chamberland (fig. 52). Une pompe foulante communique par un tuyau métallique avec l'appareil proprement dit qui comprend deux parties : un réservoir (supérieur) destiné à recevoir le liquide à filtrer, et une armature (inférieure) destinée à loger la bougie Chamberland. Le réservoir rappelle par sa forme la marmite de l'autoclave. Comme elle, il est fermé à l'aide d'un cou-

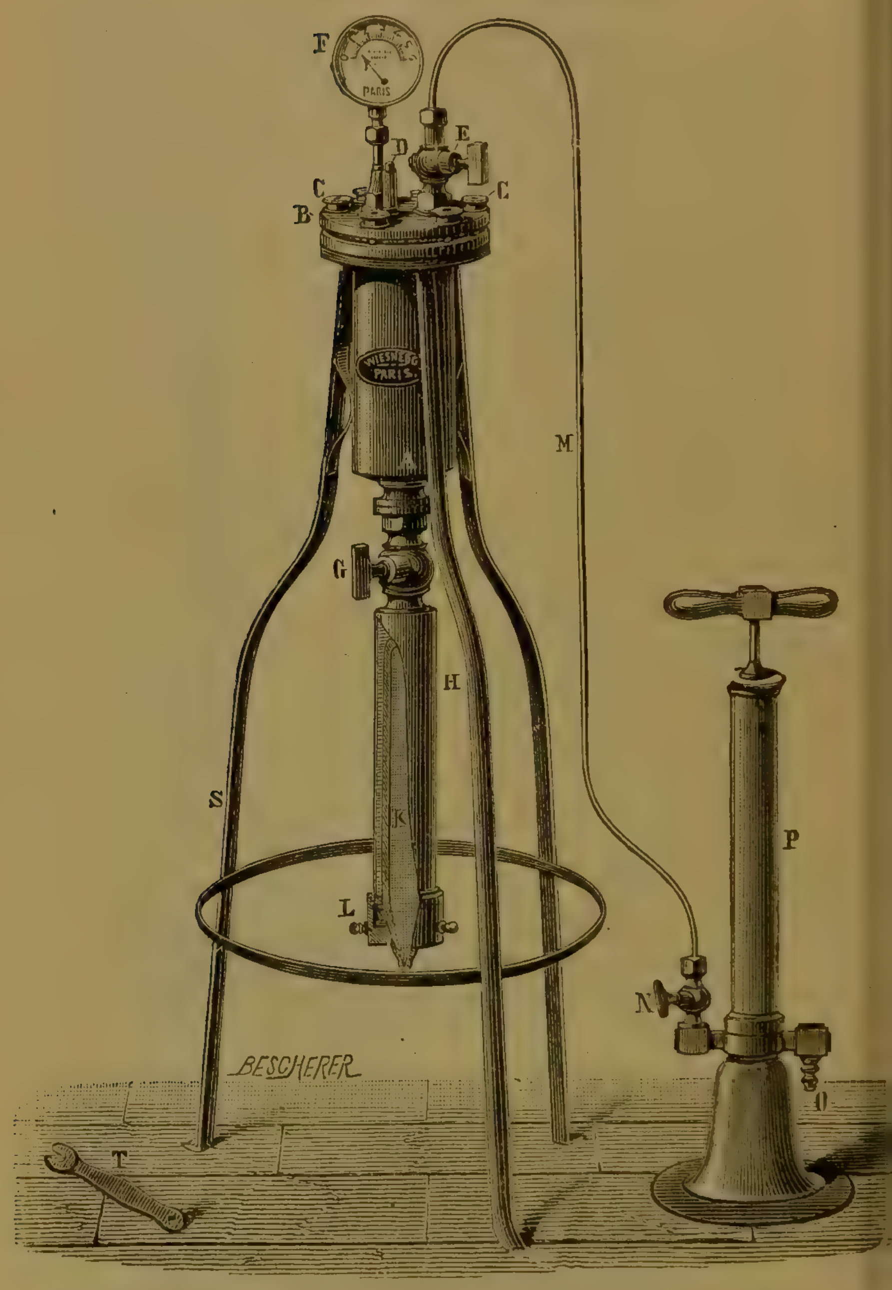


Fig. 52. — Appareil de Chamberland, pour la filtration par pression.

vercle massif qui porte sur une rondelle de caoutchouc et s'adapte à l'aide de boulons (mobiles, ici). Le couvercle est percé de 3 orifices. L'un aboutit au tube de communication avec la pompe; un robinet permet d'établir ou de supprimer à volonté cette communication. Un autre met l'intérieur du réservoir en rapport avec un manomètre. Un troisième enfin, obturé par un bouchon métallique (ou dans certains modèles par un entonnoir muni d'un robinet), permet de verser le produit à filtrer sans être obligé d'enlever le couvercle (lors d'une filtration continue). A son extrémité inférieure, la cavité se continue par un tube plus ou moins étroit, muni d'un robinet, avec l'armature qui contient la bougie filtrante, dont la disposition est analogue à celle que nous avons décrite pour l'appareil Martin. La marche de l'opération est la suivante.

Prendre une bougie Chamberland dûment éprouvée, adapter à la tetine un tube de caoutchouc terminé par un tube de verre dont l'extrémité effilée a été fermée à la lampe. Envelopper le tout dans une feuille de papier et stériliser à l'autoclave. Adapter la bougie dans le cylindre métallique. Remplir ce cylindre exactement avec le produit à filtrer. Visser l'armature. Fermer le robinet qui la fait communiquer avec le réservoir. Relier ce réservoir à la pompe foulante, après s'être assuré que le couvercle est bien boulonné. Verser le produit à filtrer à l'intérieur du réservoir (on peut le verser également avant de remettre le couvercle). Visser le bouchon métallique (ou fermer le robinet de l'entonnoir).

Le robinet de communication avec la pompe foulante est alors ouvert. La pompe est actionnée. L'aiguille du manomètre indique bientôt une pression de 1 1/2 à 2 atmosphères, qu'il ne faut pas dépasser. On ferme le robinet qui communique avec la pompe

et on ouvre celui qui relie l'armature au réservoir. Le liquide à filtrer se trouve comprimé entre la bougie filtrante et la paroi interne du cylindre. Il n'existe pour lui d'autre voie d'échappement que le passage à travers les pores de la bougie. Il passe donc dans la cavité de celle-ci et vient sortir par la tetine. On n'a pas attendu ce moment pour le recueillir. Avant d'actionner la pompe, on a coupé au couteau à verre l'extrémité du tube effilé et après flambage on l'a fait plonger dans un vase stérile, au travers du papier qui coiffe ce vase; ou, mieux encore, on l'a insinuée avec précaution dans un ballon fermé à l'ouate, en la glissant entre l'ouate et le col. Lorsqu'on veut être sûrement à l'abri de toute contamination, il est indiqué de relier d'avance par le tube de caoutchouc la tetine de la bougie à un matras tritubulé, analogue à celui qu'emploie l'appareil de Chamberland basé sur l'aspiration (*ubi supra*). La nécessité de placer par terre le vase récepteur lors de la filtration doit faire redoubler de soins dans la manière d'opérer, surtout lorsqu'il s'agit d'un milieu de culture ou d'un liquide destiné à être conservé quelque temps. La manœuvre terminée, on interrompt la communication entre l'armature et le réservoir; le vase qui contient le liquide filtré est retiré avec précaution (si on se sert du matras tritubulé, on procède auparavant au transvasement); le tube métallique qui communique avec la pompe est éloigné, l'armature est dévissée. Le couvercle du réservoir est démonté, la rondelle enlevée et l'intérieur de l'appareil nettoyé avec soin. Lorsqu'on a filtré des liquides virulents, le nettoyage doit être précédé d'une désinfection sérieuse par l'ébullition ou la vapeur sous pression.

3° **Théorie de la filtration.** — La filtration, qui d'une manière générale constitue un excellent pro-

cédé de stérilisation, est loin cependant de se montrer applicable à tous les cas. En raison de leur consistance, certains liquides très visqueux ne peuvent traverser les bougies. D'autre part, en même temps qu'elle arrête les microbes, la paroi filtrante retient souvent certaines substances chimiques. C'est ainsi que plusieurs diastases et toxines ne traversent pas ou traversent incomplètement les filtres. Comment expliquer ce phénomène? Pour M. Duclaux, les bougies étant composées de canaux fins, nombreux et irréguliers, favorisent au plus haut point le jeu des phénomènes d'adhésion moléculaire. Quand on filtre des liquides contenant *en suspension* de fines particules (par exemple des microbes), celles-ci se trouvent attirées par les parois, quoique les lumières des canaux dépassent sensiblement le volume des particules. Si on filtre des liquides contenant des corps *en solution*, les résultats varient selon que la solution est plus ou moins parfaite, c'est-à-dire plus ou moins éloignée de l'état de coagulation. Ainsi, parmi les albuminoïdes, on constate que le sérum passe intégralement, que l'albumine étendue de son volume d'eau passe pour 1/3 ou pour les 2/3, selon la nature du filtre et la pression et que les 7/8 de la caséine sont retenus. Parmi les diastases, les unes filtrent très bien (pepsine), les autres mal (trypsine). Entre les deux se trouvent tous les intermédiaires. De même pour les toxines végétales ou microbiennes. La toxine diphtérique s'affaiblit fort peu par filtration; l'abrine énormément (il n'en passe guère qu'un quart). Il n'est pas jusqu'aux composés minéraux qui ne puissent éprouver de la part des bougies des modifications sensibles. Notons enfin l'importance de la réaction du liquide; les liqueurs alcalines passent plus lentement que les liqueurs acides parce qu'elles *mouillent* les canaux des filtres. Comme l'a fait remarquer M. Duclaux, et comme on

le constate avec la plus grande facilité, les substances arrêtées par les bougies forment un second filtre qui peut retenir des éléments que le premier eût laissé passer. C'est ainsi qu'on voit les venins bien filtrer en milieu aqueux et filtrer plus ou moins mal en milieu albumineux.

4° Stérilisation par les antiseptiques.

Les antiseptiques, d'un usage courant dans les services de chirurgie, tiennent dans les laboratoires de bactériologie une place beaucoup moins grande. On les emploie presque exclusivement pour la désinfection des mains après un contact dangereux, ou encore pour celle des surfaces cutanées avant les inoculations expérimentales. On ne saurait guère compter sur les antiseptiques pour la désinfection d'instruments. On peut parfois conserver quelques heures, dans une solution d'acide phénique, des pinces, bistouris, ciseaux, etc., préalablement bouillis. On stérilisera exceptionnellement une seringue de Pravaz en la maintenant pleine de la même solution. Dans les deux cas, bien entendu, le désinfectant devra être finalement éliminé par un rinçage à l'eau stérilisée. Le grand obstacle à l'emploi des antiseptiques en technique bactériologique vient de ce que, si des quantités assez notables sont nécessaires pour amener la mort des micro-organismes, de faibles traces suffisent à s'opposer au pullulement des germes. On conçoit dès lors que le rôle des antiseptiques doive se borner à entraver le développement des microbes dans des liquides de l'asepsie desquels on n'est pas absolument certain et qui ne serviront jamais de milieux de culture. C'est ainsi qu'on mettait jadis, dans les flacons de sérum antidiphtéritique ou antitétanique, une parcelle de thymol ou de camphre.

Nous additionnons encore actuellement de 0,4 pour 100 d'acide phénique le sérum de la peste bovine, qui doit être manipulé sous des volumes de 70 litres et plus, pour opérer des mélanges d'activité toujours égale.

Une application intéressante des antiseptiques à la stérilisation a été fournie par M. Roux. Les expériences de Koch et de Chamberland avaient établi le pouvoir antiseptique de certaines essences, les essences d'ail et de moutarde entre autres. Malgré leur faible solubilité dans les liquides, elles font périr rapidement les microbes non sporulés. M. Roux utilise ces propriétés pour la stérilisation des cultures et l'isolement de certaines toxines. Les essences n'altèrent point sensiblement les matières albuminoïdes ni les diastases, d'autre part elles sont volatiles. Quand elles ont agi, on évapore le liquide dans le vide à une basse température (30° au maximum). Il reste un résidu stérile, qui n'a subi aucune réaction brutale et qui renferme les produits actifs. Le chloroforme et l'éther, dont on connaît les propriétés nettement antiseptiques, peuvent être employés dans le même but. L'éther a été appliqué par l'un de nous à l'isolement du bacille tétanique dans des cultures impures. Celles-ci sont additionnées d'un excès d'éther ; on laisse en présence vingt-quatre heures ; on évapore ; les spores du bacille de Nicolaïer demeurent seules vivantes. M. van de Velde a employé également l'éther pour tuer les staphylocoques dans les exsudats qui contiennent de la leucocidine, sans détruire celle-ci.

Reprenant une expression déjà employée, nous conclurons que les antiseptiques sont plutôt des agents de *désinfection* que des agents de *stérilisation*. Chacun comprendra la différence pratique que nous établissons entre ces deux termes, en apparence synonymes.

II. *Transvasement des liquides stériles.*

Nous avons indiqué les différents procédés de stérilisation applicables aux récipients et milieux de culture. Nous devons nous demander maintenant comment on peut faire passer, sans risquer de le souiller, un liquide privé de germes d'un vase stérile dans un autre vase stérile. Le procédé de transvasement le plus simple est celui qui s'opère à l'aide de la *pipette Pasteur* (fig. 53). Cette pipette est d'un usage de tous les instants dans les laboratoires de bactériologie. Nous devons donc insister sur sa préparation. On prend un tube de verre de faible diamètre (5 millimètres par exemple) et on le débite en fragments de 30 centimètres de long environ, à l'aide d'un couteau à verre. La partie médiane d'un tube ainsi préparé sera portée dans la flamme chauffante d'un chalumeau. Le tube est tenu légèrement incliné et on le tourne constamment d'un mouvement lent et uniforme de manière à chauffer également toute sa circonférence. Lorsque le verre est bien ramolli, on le sort de la flamme et prenant à l'aide des coudes un point d'appui solide sur la table de la soufflerie, on étire le tube. On aura

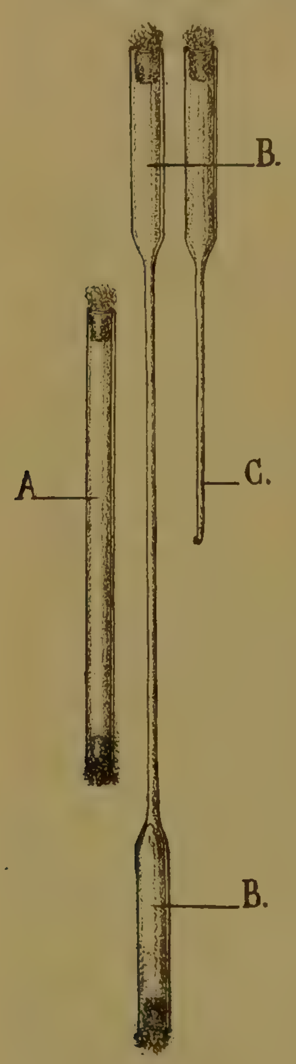


Fig. 53. — Fabrication d'une pipette Pasteur.

présentes à l'esprit les recommandations suivantes :

a) Il importe de ne pas se presser, sans quoi on risque de faire des pipettes irrégulières, bosselées, inutilisables. Si le verre a été sorti de la flamme bien ramolli, on a tout le temps nécessaire pour l'étirer convenablement.

b) Au moment où on l'étire, le tube ne doit plus être tenu obliquement mais au contraire horizontalement. On y arrive très facilement, avons-nous dit, en appuyant les coudes sur la table.

c) Il faut éviter les effilures trop longues, partant très fragiles. Lorsque les tubes sont étirés, on les sépare et on ferme en même temps les deux effilures à l'aide d'un coup de soufflerie. On introduit dans la grosse extrémité de chaque tube un petit tampon de coton. Toutes les pipettes sont alors mises dans un panier métallique, l'extrémité étirée en haut, et on stérilise au four Pasteur.

On peut également placer un tampon de coton à chacune des extrémités des fragments de verre, stériliser au four Pasteur et n'étirer en pipettes qu'au moment du besoin.

Notons encore qu'il est bon d'avoir des pipettes munies d'effilures de différents diamètres. Le pus, par exemple, ne peut être aspiré que dans une effilure un peu grosse. On disposera aussi de quelques pipettes à effilures recourbées, pour éviter, dans certaines manipulations délicates, que des gouttes de liquide ne viennent à tomber à un moment inopportun. On peut enfin étrangler quelques pipettes à leur tiers supérieur, pour les transformer plus tard en ampoules. Cet étranglement doit être pratiqué le plus près possible du bouchon, tout en ayant soin de ne pas noircir celui-ci.

Les usages de la pipette Pasteur sont multiples. Elle sert couramment aux ensemencements, surtout

lorsqu'on veut porter dans un ou plusieurs milieux de culture une quantité notable de semence liquide ou demi-liquide. Elle sert aussi, à chaque instant, pour recueillir des liquides organiques ou des pulpes d'organes. Lorsqu'on désire faire un prélèvement, on commence par flamber la pipette puis on casse sa pointe et on flambe à nouveau l'effilure. Quand le verre est refroidi, on aspire lentement, en suivant attentivement l'ascension du liquide. Il faut veiller avec le plus grand soin à ce que celui-ci ne vienne pas souiller le coton, et à plus forte raison ne le traverse pas pour pénétrer dans la bouche. On évitera aussi l'entrée des bulles d'air. Si le liquide aspiré est destiné à être conservé, on ferme l'effilure dans une flamme, en s'aidant d'une pince. Il est indiqué, dans le cas d'un produit virulent, de raccourcir ensuite progressivement la pointe jusqu'à ce qu'on ait ainsi éliminé par fusion toute la partie qui a été souillée extérieurement.

Dans certains cas, le contenu d'une pipette doit être conservé à l'abri de l'air. Celle-ci est alors fermée à la lampe, au-dessus du tampon de coton repoussé au préalable. On peut employer également une pipette étranglée au-dessous du coton ; on aspire le liquide jusqu'à un niveau un peu inférieur à celui de l'étranglement, qui est alors scellé à la lampe après fermeture de l'effilure.

Lorsqu'on désire recueillir le liquide renfermé dans une pipette, on fait un trait à l'aide du couteau à verre au niveau de la partie moyenne du tampon d'ouate, on rend ce trait circulaire avec l'extrémité d'une tige de verre rougie à la flamme, on rejette la partie supérieure du tube, on débouche la pipette et on fait des prélèvements. Le prélèvement terminé, la pipette est rebouchée et on flambe la partie du coton qui dépasse. S'il s'agit d'une ampoule, on fait un

trait circulaire au niveau d'une des extrémités, on ouvre et on aspire le contenu avec précaution. La pipette Pasteur peut acquérir une plus grande capacité, si à sa partie moyenne on souffle une boule.

On se sert parfois, pour le transvasement des liquides, du *tube de Miquel* qui n'est qu'une pipette, à boule légèrement modifiée.

Plus employé est le *ballon-pipette Chamberland* (fig. 54), qui rend de grands services lorsqu'on a à transvaser des quantités de liquides un peu considérables. Ses seuls inconvénients sont un prix de revient élevé et la grande fragilité de l'effilure. Il est constitué par un ballon à fond plat, surmonté d'un tube incliné à 45° et étranglé de façon à pouvoir maintenir un tampon de coton. Une effilure latérale deux fois recourbée est d'autre part soudée à l'appareil. Le ballon est stérilisé à l'autoclave ; l'effilure a été au préalable fermée à la lampe et le tube supérieur garni d'une bourre de ouate. L'appareil est alors prêt à servir. Il suffit de flamber l'effilure, d'en couper l'extrémité avec un couteau à verre, de flamber à nouveau, de laisser refroidir et d'aspirer le liquide contenu, par exemple, dans un ballon. Pour ce faire, on glisse l'effilure entre la ouate et le col de ce ballon. S'il s'agit d'un ballon rond scellé, dépourvu de coton, il faut, de toute nécessité, l'ouvrir largement. On fait un trait au couteau à verre et on touche la surface entamée avec un charbon de

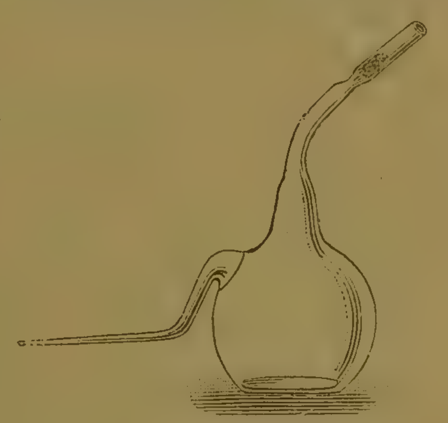


Fig. 54. — Ballon-pipette Chamberland.

Berzélius porté au rouge. Si le verre ne cède qu'en un point, on promène circulairement le charbon, à partir de ce point, pour compléter la fissure. Puis on fait reposer le ballon sur un rond en paille en inclinant le col, on ouvre et on introduit profondément et d'un seul coup l'effilure du ballon-pipette. Les dernières portions de liquide, correspondant à la surface sur laquelle ont pu éventuellement tomber quelques germes, ne seront pas prélevées.

Le liquide aspiré, on le distribue, soit dans des tubes à essai, soit dans des ballons. S'il s'agit de tubes, il n'y a pas d'inconvénient (après avoir flambé leur orifice et au besoin leur tampon de ouate) à les déboucher pour introduire l'effilure du matras-pipette. S'il s'agit de ballons, il faut glisser cette effilure entre le coton et le col.

Quand on veut conserver un liquide dans le matras de Chamberland, on peut sceller l'effilure à la lampe, mais cette précaution est superflue, car le matras se comporte comme le ballon à effilure contournée dont Pasteur s'est jadis servi pour ruiner définitivement la théorie de la génération spontanée et de la soi-disant force végétative des infusions stérilisées.

Dans les transvasements portant sur des quantités notables de liquide, il est indiqué de se servir d'une *pissette stérilisée*, très facile à préparer. C'est la pissette ordinaire des chimistes. Sur le trajet de l'effilure, on interpose un bout de caoutchouc muni d'une pince de Mohr.

Il n'y a rien de spécial à dire au sujet du transport aseptique des corps solides (fragments d'organes, produits pathologiques, etc.). On les saisira avec des pinces stériles et on abrégera le plus possible le temps de leur traversée dans l'air.

CHAPITRE IV

VASES DE CULTURE. — MILIEUX DE CULTURE EN GÉNÉRAL. — MILIEUX LIQUIDES

I. *Vases de culture.*

A. Généralités.

Avant d'aborder l'étude des milieux nutritifs, nous devons dire un mot des vases destinés à les contenir. Un récipient quelconque ne peut pas servir à cultiver les microbes. Les vases de culture doivent en effet remplir certaines conditions résumées dans les quelques propositions suivantes :

a) Ils seront commodes à manier, à obturer, à stériliser. Ils seront par contre difficiles à infecter.

b) Ils permettront de suivre facilement des yeux les résultats de l'ensemencement.

c) Ils ne seront enfin ni trop fragiles, ni d'un prix de revient trop élevé.

Remarquons toutefois que si la bactériologie emploie dans les laboratoires des vases transparents, elle fait usage au contraire d'appareils opaques, au fur et à mesure qu'elle s'étend et s'industrialise. Dans ces conditions, les manipulations demandent naturellement à être conduites avec grand soin. Mais il y aurait peut-être intérêt à se familiariser, même dans les laboratoires, avec les vases de culture opaques. Les avantages de ceux-ci n'ont pas besoin d'être longuement développés. Bornons-nous à signaler qu'on peut leur donner des dimensions volumi-

neuses et une complexité illimitée et qu'ils offrent une résistance précieuse au bris et à la chaleur.

B. Variétés.

Les vases de culture se divisent en deux classes, suivant qu'ils sont destinés à contenir des milieux nutritifs liquides ou solides.

1° **Vases de culture destinés à contenir des milieux liquides.** — Un appareil très simple et qui convient parfaitement à la culture en milieu liquide est le *tube à essai* (fig. 55) des chimistes. Il remplit parfaitement toutes les conditions énumérées. Il est de beaucoup l'appareil le plus usité en bactériologie. Chaque tube recevra environ 3 travers de doigt de milieu liquide. Dans ces conditions, la surface exposée à l'air est relativement faible en comparaison



Fig. 55. — Tube à essai.

de la hauteur du liquide; on y remédiera, si l'on veut, en inclinant le tube une fois ensemencé (culture de microbes très aérobies). Bien que les tubes à essai ne tiennent ni à l'autoclave ni à l'étuve une place bien considérable, on pourrait encore leur reprocher d'être trop gros. En effet, soit qu'on veuille entretenir une culture, soit qu'on désire l'inoculer, il serait aisé en général de se contenter d'une faible quantité de liquide et, partant, de tubes sensiblement moins volumineux. Ces petits tubes, si faciles à stériliser dans une simple flamme, rendraient en particulier de très grands services dans les laboratoires volants.

Le *tube de Gayon*, modification du tube à essai, est surmonté d'un couvercle de verre identique à celui des matras Pasteur.

Ces *matras Pasteur* (fig. 56) représentent de petits ballons à fond plat, en verre léger. Ils sont fermés à l'aide d'un bouchon à l'émeri, creux et terminé par un petit tube de verre qu'obstrue un tampon de coton. Les matras Pasteur sont fragiles et difficiles à nettoyer ; leur prix de revient est élevé et les bouchons ne conviennent d'ordinaire qu'aux matras correspondants (il importe donc de numéroter les uns et les autres). En revanche, ils résistent bien à la chaleur ; ils permettent de conserver longtemps à l'étuve une culture donnée et, lors des ensemencements, on n'a aucun tampon de coton à enlever, ce qui, pour les cultures de tuberculose par exemple, constitue un avantage. Le capuchon de verre est parfois assez difficile à détacher du matras. Pour éviter cet inconvénient, on lubrifiera toujours les surfaces de contact avec une trace de vaseline. On remplace couramment le matras Pasteur par des ballons à fond plat dont le col a été coupé assez court. Ces ballons s'opposent moins bien à l'évaporation, mais ils sont très économiques. D'où leur emploi dans la préparation de la tuberculine, de la malléine et dans bien d'autres cas, où l'on veut faire un grand nombre de cultures liquides « massives ».

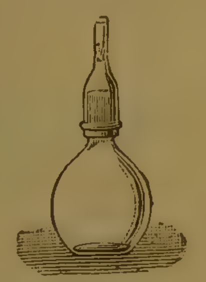
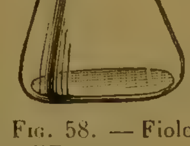

Fig. 56. — Matras Pasteur.


Fig. 57. — Flacon de Frendenreich.


Fig. 58. — Fiole d'Erlenmeyer.

Le flacon de Freudenreich (fig. 57) est un matras Pasteur cylindrique.

Les fioles coniques [*d'Erlenmeyer* (fig. 58) et de *Gayon* (fig. 59)], conviennent aux microbes qui, pour

végéter, ont besoin de beaucoup d'air. La fiole de Gayon est munie d'un bouchon à recouvrement comme le matras Pasteur. La fiole d'Erlenmeyer n'offre pas de capuchon, et doit être obturée comme un tube à essai.

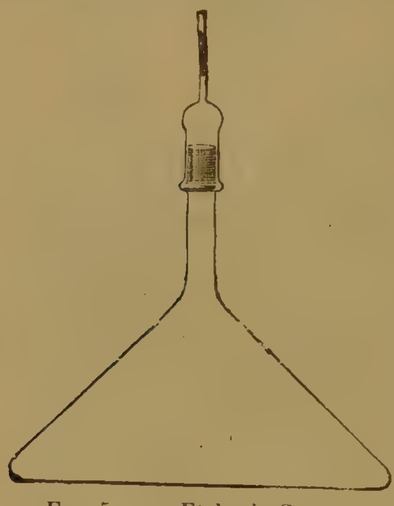


Fig. 59. — Fiole de Gayon.

Si l'on désire renouveler l'air dans l'un des appareils précédents, on peut simplement sortir le vase de l'étuve, le mettre dans une pièce froide et le replacer ensuite à l'étuve. L'air de l'appareil se contracte d'abord, puis se dilate et il s'ensuit un échange avec l'air extérieur. Mais lorsque, dans la préparation de certaines toxines par exemple,



Fig. 60. — Matras de Fernbach.

il devient nécessaire de faire passer un courant d'air à la surface d'un bouillon de culture, on emploie le matras de Fernbach (fig. 60), ou le ballon de culture

de Roux (muni habituellement d'un flacon laveur) (fig. 61) qu'il est très facile de mettre en communication avec une trompe à eau.

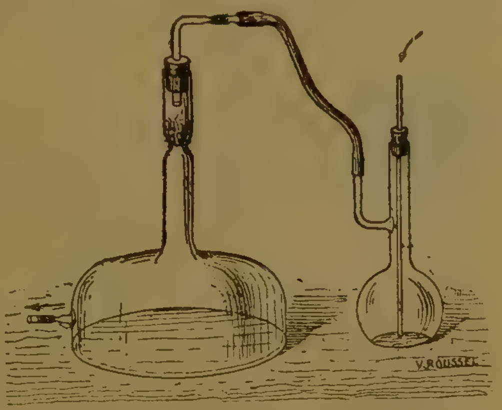


Fig. 61. — Ballon de culture de M. Roux.

Si on se trouvait pris au dépourvu, on pourrait à la rigueur remplacer les vases qui précèdent par des *fioles à médicaments*, de dimensions variées selon les cas. La *pipette Pasteur*, qui offre sur tous les autres appareils l'avantage d'une facilité de fabrication et de transport très grande, peut très bien, elle aussi, être usitée pour la culture des microbes.

2° **Vases de culture destinés à contenir des milieux solides.** — Le *tube à essai* peut contenir des milieux


Fig. 62. — Tube de Roux.

solides comme la gélatine, la gélose, le sérum coagulé. Les demi-cylindres de pommes de terre sont placés dans de gros tubes à essai étranglés à quelques centimètres au-dessus de leur extrémité inférieure et nommés *tubes de Roux* (fig. 62). Les *boîtes de Pétri* (fig. 63), les *boîtes à rainure* (fig. 64) servent à contenir des tranches de fruits, de pommes de terre, de carottes. Plus fréquemment encore, on y coule de la gélatine ou de la gélose.


Fig. 63. — Boîte de Pétri.

Dans ce dernier cas, il peut y avoir avantage à employer la *boîte de Berthier* (fig. 65), que représente notre figure, et qui s'infecte très difficilement ; elle convient surtout pour les cultures massives. La *fiole* de *Gayon* est très employée pour l'analyse des eaux. Les *plaques* de *Koch* constituent un appareil de culture assez défectueux ; nous leur devons néanmoins une mention. Ce sont des lames de verre de dimensions variables (12 centimètres de long sur 10 centimètres de large le plus souvent) sur lesquelles on étend de la gélatine liquéfiée et ensemencée qui bientôt fait prise ; on les dispose horizontalement, et en croix de deux en deux, sur des supports de verre dans un grand cristallisoir. Un appareil équivalent peut s'improviser facilement avec du verre à vitre et une cloche à fromage, ou encore avec une assiette et deux plaques de verre dont la plus grande forme couvercle.


Fig. 64. — Boite à rainure.


Fig. 65. — Boîte de Berthier.

A l'exception de la pipette Pasteur, qu'il est facile de faire servir à la culture des microbes anaérobies, les appareils que nous venons de décrire servent uniquement à la culture des microbes aérobies. Les vases destinés aux cultures à l'abri de l'air sont très spéciaux. Ils seront décrits au chapitre IX.

C. Soins à donner aux vases de culture.

Avant d'être employé pour la culture des microbes, un récipient doit :

1° Avoir été stérilisé.

2° Être préservé de toute contamination par les germes extérieurs.

Les vases qui n'ont point encore servi peuvent être stérilisés d'emblée au four Pasteur ou à l'autoclave. Ceux qui ont déjà servi seront d'abord soigneusement nettoyés. Pour cela, on liquéfiera la gélatine; la gélose sera détachée de la paroi interne du récipient plutôt que liquéfiée. Il est plus difficile de se débarrasser du sérum coagulé et il y aura souvent avantage à lui faire subir un commencement de putréfaction. Il va sans dire que si le contenu des vases est virulent, ceux-ci seront préalablement stérilisés à l'autoclave. Il est parfois indispensable de nettoyer la verrerie avec de la bouillie de papier filtre. On prépare cette dernière en introduisant dans le vase des morceaux de papier et en les humectant avec un peu d'eau.

Les appareils, nettoyés le mieux possible par les moyens mécaniques, sont plongés dans une solution de carbonate de soude (5 o/o) qu'on porte à l'ébullition. On lave ensuite à grande eau, puis on fait séjourner dans un bain acidulé avec 1 à 2 pour 100 d'acide chlorhydrique brut. Après un nouveau rinçage à l'eau, on laisse égoutter soigneusement. Les vases sont alors prêts pour la stérilisation à l'autoclave. Si l'on veut recourir au flambage, il faut préalablement faire sécher les appareils dans une étuve. On peut aussi, à condition d'aller très doucement, pratiquer simultanément dans le four Pasteur la dessiccation et la stérilisation.

Avant de stériliser un appareil de culture, il faut le mettre dans des conditions telles que les germes extérieurs ne puissent plus le contaminer une fois l'opération terminée. On y arrive à l'aide du bouchage à l'ouate ou de l'enroulement dans du papier.

Le bouchage à l'ouate s'applique dans la majorité des cas aux appareils à goulot étroit : tubes à essai, tubes de Roux, fioles de Gayon, d'Erlenmeyer..., etc.

On emploiera exclusivement le coton ordinaire. La ouate hydrophile s'imprègne d'eau à l'autoclave et, de plus, coûte trop cher ; pour ces deux raisons on la rejettera.

Quand on veut boucher un tube, on forme un petit carré de coton qu'on plie en quatre. Le milieu du carré figure une sorte de coin qu'on présente à l'orifice de l'appareil et qu'on introduit par un mouvement de vis. Le bouchon de coton doit pénétrer dans le goulot à frottement dur et sur une hauteur d'un à deux centimètres. Il doit dépasser ce goulot d'une quantité presque égale, de façon à former au-dessus de lui un panache très utile pour la préhension. Les fioles de Gayon, les matras Pasteur, etc., peuvent être munis par précaution de deux tampons de coton superposés et de dimensions inégales. L'un obture le goulot même de l'appareil, l'autre la cheminée creuse qui surmonte le bouchon de verre.

D'une façon générale, il faut éviter l'emploi de tampons d'ouate trop denses, qui limiteraient l'aération.

On entoure de papier les appareils qu'on ne peut obturer avec du coton (verres à expériences, boîtes de Pétri, boîtes à rainures, cristallisoirs, plaques de Koch..., etc.). Ainsi que nous l'avons dit, le papier d'emballage ou le papier à journaux est parfaitement suffisant, surtout si la stérilisation doit se faire au four Pasteur. Beaucoup d'appareils de culture ont des arêtes vives, susceptibles de couper le papier. On aura soin, dans ce cas, de mettre toujours plusieurs doubles. Nous rappelons enfin qu'on doit soigneusement préserver du contact avec le fond ou les parois du four Pasteur les objets entourés de papier.

Le bouchon de coton ne protège ni contre la condensation, ni contre l'évaporation, ni enfin contre les poussières le milieu de culture contenu dans le

vase. D'où la nécessité, au cours de la stérilisation à l'autoclave, de surmonter d'un cornet de papier ou d'une compresse les appareils qui renferment des milieux nutritifs. D'où aussi la nécessité, lorsque des tubes (de bouillon et, à fortiori, de gélose, de sérum, de pomme de terre) doivent être conservés à l'étuve à 37° pendant un temps assez long, de surmonter le tampon de coton d'un capuchon de caoutchouc. Pour ce faire, on flambe l'ouate, on la repousse dans le tube, on laisse refroidir, et on adapte le capuchon sans l'enfoncer trop, ce qui l'exposerait à se couper sur le bord du tube. Pendant l'été, et dans les climats où l'évaporation est plus active, il est bon de coiffer également d'un capuchon les milieux nutritifs non ensemencés (sérum, gélose, gélatine) qui ne doivent pas être utilisés immédiatement et dont on désire néanmoins préparer d'avance une certaine quantité. Il existe des capuchons de caoutchouc de différents diamètres, susceptibles de s'adapter aux tubes à essai, aux ballons, etc. Les capuchons de caoutchouc rouge sont en général de meilleure qualité que les gris ; cependant, la soudure en est moins solide et, si le goulot de l'appareil est un peu large, ils peuvent se fendre de haut en bas. Nous ne pensons pas qu'il soit nécessaire de stériliser les capuchons lorsque les cultures ne doivent pas être conservées longtemps ; ce qui importe surtout c'est de ne les employer qu'à l'état de siccité absolue. S'il s'agit au contraire de cultures prolongées ou de cultures que l'on veut garder plusieurs semaines et davantage, on se servira de capuchons stérilisés à l'autoclave dans un flacon que l'on fait ensuite séjourner à l'étuve pour les dessécher complètement. Nous rejetons absolument la stérilisation par le sublimé. Lorsque les capuchons ne sont pas secs, il se fait, entre le coton et leur face interne, une petite chambre humide où les spores

de moisissures, accidentellement introduites, germent très facilement. Le mycelium qui en naît s'insinue vite entre les fibrilles de l'ouate et va contaminer le milieu de culture. Les capuchons de caoutchouc pourraient être remplacés, le cas échéant, par des capsules métalliques.

Notons, en terminant, la nécessité de protéger contre les poussières les vases de culture non capuchonnés. On enveloppera dans une feuille de papier les paniers qui contiennent les tubes à essai et on laissera sur les matras, fioles, etc... le cornet qu'on avait mis pour éviter la condensation dans l'autoclave.

II. *Milieux de culture en général.*

Les milieux de culture peuvent se définir des terrains artificiels dans lesquels les microbes sont susceptibles de vivre et de pulluler. Pour se prêter à la vie des micro-organismes, ils doivent remplir trois conditions :

1° Ils contiendront tous les principes nécessaires à la nutrition de l'organisme ensemencé.

2° Ils seront absolument stériles, c'est-à-dire ne recèleront aucun germe avant leur ensemencement. On s'assure de cette stérilité, dans les cas douteux, en mettant les milieux nutritifs à l'étuve à 37° aussitôt après leur fabrication et en les y maintenant pendant quelques jours.

3° Sauf quelques exceptions que nous mentionnerons par la suite, ils doivent être de réaction neutre ou légèrement alcaline.

Les milieux nutritifs se divisent tout naturellement en deux grandes catégories, les milieux liquides et les milieux solides, que nous étudierons successivement. Les uns et les autres ont leurs avantages et

leurs indications et on ne peut songer à les opposer entre eux. Les milieux liquides se prêtent mieux à l'étude des propriétés biologiques des microbes. Ils permettent seuls de recueillir directement les produits élaborés par eux. Les milieux solides s'emploieront électivement lorsqu'il s'agira de séparer des micro-organismes (dans une analyse d'eau, de poussières, etc...) ou lorsqu'on voudra contrôler la pureté d'une culture. Remarquons que la distinction entre milieux solides et milieux liquides est du reste assez arbitraire. Certains milieux, comme le sérum par exemple, peuvent être employés soit à l'état solide, soit à l'état liquide. D'autre part, la gélatine passe aisément de l'un à l'autre état, ce qui constitue, selon le point de vue où l'on se place, tantôt une qualité précieuse et tantôt un grave défaut.

III. *Milieux liquides.*

On peut les diviser en quatre groupes :

Les milieux chimiques, ou liquides minéraux des auteurs.

Les milieux empiriques (infusions végétales ou animales).

Les liquides organiques naturels.

Enfin les milieux qui résultent d'une combinaison de plusieurs des liquides précédents (milieux combinés).

A. **Milieux chimiques** (liquides minéraux).

Imaginés par Pasteur, pour ses études sur les fermentations, les liquides minéraux ont été les premiers employés en bactériologie. Ils sont constitués par une solution aqueuse de substances chimiques bien définies et ne méritent nullement le nom de miné-

raux que nous n'avons conservé que par tradition. On trouvera, à la fin de ce volume, la formule de divers liquides composés par Pasteur ainsi que celle des solutions de Jaksch (fermentation ammoniacale), de Mayer (fermentation alcoolique), etc...

Tout aussi classiques que les liquides Pasteur, sont les liquides de Cohn pour la culture du b. termo, et de Raulin pour l'étude de l'aspergillus niger. Ce dernier milieu est célèbre par les beaux travaux dont il a été le point de départ. Ce qui le caractérise plus spécialement, c'est la présence du fer et du zinc, qu'on est peu habitué à rencontrer dans les milieux nutritifs. La récolte diminue beaucoup si on enlève le zinc. Quant au fer, il ne représente pas un aliment, mais un antidote neutralisant certaines substances toxiques sécrétées par l'aspergillus.

Délaissés pendant longtemps, les milieux minéraux jouissent depuis quelques années d'un regain d'actualité. On est arrivé, en effet, à trouver pour un grand nombre de micro-organismes, un milieu défini dans lequel ils se développent parfaitement, ou tout au moins suffisamment pour permettre certaines études chimiques. Tel est le cas pour le bacillus viridis (liquide de Cathelineau), pour le prodigiosus (liquide de Scheurlen), pour le pyocyanique (liquide de Gessard), pour le bacille de Koch (liquides de Kühne, de Petermann, de Proskauer et Beck), pour le b. coli et le b. d'Eberth (liquides de Péré)..., etc. On sait aussi que le liquide de Maassen a été recommandé dans l'étude des organismes phosphorescents. D'autres solutions ont été appliquées au diagnostic différentiel des micro-organismes; ainsi l'ensemencement du b. coli et du bacille d'Eberth en milieu Fränkel constitue un des meilleurs moyens de les distinguer l'un de l'autre. On peut enfin rempla-

cer certains milieux végétaux par des milieux définis de formule chimique équivalente. Ainsi M. Grimbert a donné la composition d'un jus de pommes de terre artificiel, dont nous parlerons à propos de la gélatine. Pour quelques auteurs, les milieux chimiques offriraient l'avantage d'un isolement plus commode des toxines. Il serait très facile, a-t-on dit, de faire pousser dans le milieu d'Uschinsky le b. de Löffler et le b. tétanique; la toxine s'extrairait ensuite très aisément. Ces faits ont été contestés. M. Marmier isole la toxine charbonneuse d'un liquide artificiel, mais ce liquide renferme aussi de la peptone, corps non défini. Le milieu Marmier se trouve, pour cette raison, à la limite des milieux chimiques et des milieux empiriques.

De la préparation des milieux chimiques, nous n'avons rien à dire. On trouvera, à la fin de cet ouvrage, la formule de ceux qui viennent d'être indiqués et de quelques autres. Toute la difficulté a consisté, au moment de leur élaboration, dans le choix judicieux des produits qui devaient les composer et dans celui des doses auxquelles ils devaient y entrer. La formule une fois donnée, il suffit de l'appliquer simplement.

B. **Milieux empiriques.**

a) **Infusions végétales.** — Les infusions végétales ont, en technique bactériologique, des indications assez restreintes. On les emploie surtout pour la culture des moisissures, des levures, des streptothricées. C'est ainsi que la streptothricée de l'actinomycose, celles du farcin du bœuf et du pied de Madura, le streptothrix d'Eppinger..., etc., donnent de belles cultures en *bouillon de pomme de terre*. Ce bouillon se prépare de la façon suivante : on incorpore, à un

demi-litre d'eau, de 10 à 20 grammes de pulpe de pommes de terre, obtenue à l'aide d'une râpe de nickel. On laisse macérer pendant deux heures; on passe à travers un linge; on fait bouillir; on filtre; on répartit dans des tubes à essai et on stérilise à l'autoclave. La légère acidité du milieu est favorable au développement des microbes indiqués. Le jus de pommes de terre, additionné de 4 pour 100 de glycérine, a été appliqué par M. Lubinski à la culture du bacille de Koch, dont on connaît l'étroite parenté avec les streptothricées. On l'emploie soit liquide, soit gélosé. La croissance du bacille est tout particulièrement rapide, à condition toutefois qu'on ait habitué le bacille tuberculeux au milieu. Nous retrouverons enfin le jus de pommes de terre incorporé à la gélatine, lorsque nous décrirons le milieu d'Elsner.

L'infusion de foin (ou thé de foin) s'obtient en hachant 15 grammes de foin et en les laissant macérer pendant deux heures dans un litre d'eau. On fait bouillir dix minutes; on filtre et on répartit dans des tubes à essai, qui sont stérilisés à l'autoclave. Ainsi obtenue, l'infusion présente une belle couleur jaune d'or. Elle est généralement neutre, quelquefois un peu acide. Lorsque les plantes employées proviennent d'un terrain calcaire, elle peut être légèrement alcaline. Parmi les bactéries qui poussent bien dans l'infusion de foin, nous citerons le b. subtilis et la streptothricée du pied de Madura (Vincent).

L'infusion de paille se prépare absolument comme la précédente. On l'a vantée pour la culture des amibes (Schardinger).

Eau de levure. Délayer 10 grammes de levure dans 100 grammes d'eau, en évitant la formation de grumeaux. Faire bouillir un instant, en agitant le mélange avec une baguette de verre. Filtrer. Répartir en tubes et stériliser. Le milieu ainsi obtenu est légèrement

acide si on emploie la levure des brasseurs. Il est au contraire alcalin si on fait usage de la levure des boulangers.

Eau de malt. Broyer 10 grammes d'orge germée. Les incorporer à 100 grammes d'eau. Chauffer pendant une heure à 55°-58°. Avoir soin de ne pas dépasser ce degré, sans quoi on détruirait la diastase qui transforme l'amidon en maltose. Après une heure, on porte à l'ébullition pendant quelques minutes. On filtre ; on répartit en tubes et on stérilise.

Infusion de touraillons (plantules d'orge germée). Se prépare en incorporant 5 grammes de touraillons à 100 grammes d'eau et en chauffant pendant une heure à 55°-58°. Au bout d'une heure on fait bouillir quelques minutes ; on filtre ; on répartit en tubes à essai et on stérilise à l'autoclave.

Bouillon de haricots (sucré). Il est considéré par M. Mazé comme le milieu électif pour la culture du microbe des nodosités des légumineuses. On fait infuser des haricots blancs à 100 degrés pendant une demi-heure (il faut éviter de pousser jusqu'à la cuisson, pour que la fécule ne se répande pas dans le liquide). On ajoute 2 pour 100 de saccharose, 1 pour 100 de chlorure de sodium et des traces de bicarbonate de soude. Ce bouillon peut être employé tel quel, ou solidifié par addition de 1,5 pour 100 de gélose.

On sait que le *vin* a servi jadis aux expériences de Pasteur. Complètement délaissé aujourd'hui, il n'a plus qu'un intérêt historique.

Mentionnons encore l'infusion de fruits secs, utilisable pour la culture des moisissures et le jus de navets à 2 pour 100 et le jus de carottes à 2 pour 100 recommandés par M. Vincent pour l'étude de la streptothricée du pied de Madura.

b) **Infusions animales.** — I. Bouillon classique. — Les infusions animales, dont le type est le bouillon de viande peptonisé, sont de beaucoup les milieux les plus employés pour la culture des microbes. Leur importance en technique bactériologique légitime le développement que nous croyons devoir donner à ce paragraphe.

L'usage de bouillon simple, c'est-à-dire non additionné de peptone, est exceptionnel. Pasteur s'en servit jadis, mais depuis les travaux de M. Koch on a recours presque exclusivement au bouillon peptonisé. La préparation de ce milieu n'offre aucune difficulté. Il convient au plus grand nombre des micro-organismes ; il est facile de lui incorporer diverses substances, susceptibles de favoriser la croissance de certaines espèces. Son seul inconvénient réside dans une différence de composition assez grande d'un cas à un autre, en rapport avec la différence de composition de la viande et de la peptone. Nous devons entrer à ce sujet dans quelques détails.

La constitution du bouillon différera tout d'abord suivant l'espèce animale qui aura fourni la viande. La plus employée est la viande de bœuf, mais dans certains cas on se sert également de la viande du cheval, du poulet (choléra des poules), des poissons (organismes phosphorescents), etc. Les différences de composition, liées à la différence des espèces, sont parfois assez notables. C'est ainsi que le bouillon de poissons ou de reptiles se fait remarquer par sa pauvreté en albuminoïdes et sa richesse en sels. Le bouillon de cheval contient une forte proportion de glycogène, le bouillon de moules une proportion encore plus considérable, etc.

La constitution du bouillon variera ensuite avec l'âge de l'animal dont provient la viande et avec la fraîcheur, plus ou moins grande de celle-ci. Il est in-

diqué dans certains cas d'employer de la viande très fraîche, de la viande du jour si possible. D'autres fois, il est préférable de faire usage d'une chair musculaire légèrement putréfiée.

Presque toujours c'est le tissu musculaire qui est utilisé pour la fabrication du bouillon. Quelquefois cependant on emploie les viscères et on fait des bouillons de rate, de foie, de poumon, etc., qui se reconnaissent à leur opalescence. La chair musculaire, ou viande proprement dite, contient environ 24 pour 100 de résidu fixe, dont 18 pour 100 d'albuminoïdes, la plupart coagulables ; plus de 1 pour 100 de matières extractives (créatine, créatinine, etc.), plus de 1 pour 100 de sels minéraux. La viande est riche en phosphore et en potasse, pauvre en chlore et en sodium, d'où l'obligation d'ajouter du sel marin lors de la préparation du bouillon. Elle contient de l'acide sarco-lactique, qui donne au jus de viande son acidité. Elle renferme enfin une quantité très variable (0,6 pour 100 en moyenne) de matières sucrées (glycogène, inosite, traces de maltose ou de glucose) qui se retrouvent dans le bouillon. D'après M. Th. Smith, 75 pour 100 des bouillons contiennent des quantités de sucre allant d'une trace à 0,3 pour 100. Il est important, dans certains cas, de s'en débarrasser ; on peut y arriver à l'aide de différents procédés, dans lesquels on fait consommer le sucre par les microbes. M. Spronck conseille de laisser légèrement putréfier la viande ; M. Martin préfère ensemencer le jus exprimé avec de la levure, M. Smith avec du colibacille. Ce dernier auteur a indiqué un procédé fort ingénieux, permettant de reconnaître si un bouillon contient des traces de sucre très minimes, insuffisantes pour donner des gaz ou pour former une quantité notable d'acide. Le bouillon, ensemencé avec du b. coli, est mis dans un tube à fermentation, com-

posé de deux branches écartées en V, l'une ouverte et l'autre fermée (la branche fermée est plus longue que l'autre). Si, après 24 heures, le développement microbien est limité à la branche ouverte, c'est que le bouillon ne contient pas de sucre ; il en renferme au contraire si le b. coli a poussé dans la branche fermée.

La constitution du bouillon varie enfin en fonction de la peptone. La peptone pure est hors de prix et n'offre nullement les avantages qu'on serait porté à lui attribuer *a priori*. Les peptones du commerce renferment une quantité prépondérante d'albumoses. Il n'existe à cela aucun inconvénient, car la peptone sans albumoses fournit d'ordinaire de moins belles cultures. Toutefois, l'excès d'albumoses sera également à éviter. Les marques commerciales qui renferment uniquement des albumoses (peptone Witte) sont donc inférieures d'après nous. Celles dans lesquelles le rapport des peptones aux albumoses paraît le plus favorable à la culture des micro-organismes sont la peptone française Chapoteaut et la peptone luxembourgeoise Aschmann. Nous rappellerons que les albumoses se distinguent des peptones en ce qu'elles sont précipitables par le sulfate d'ammoniaque à saturation, tandis que les peptones ne se précipitent pas à l'aide de ce réactif. Notons encore que M. Lignières vante beaucoup, pour la recherche de l'indol en particulier, la peptone pancréatique, conseillée d'abord par M. Péré. Nous verrons enfin, à propos de la préparation du bouillon Martin, un moyen facile de fabriquer soi-même une excellente solution de peptone.

Ces points établis, le bouillon peptonisé à 1 o/o se prépare de la façon suivante : prendre 500 grammes de viande sans graisse, ni aponévroses, ni tendons. Les hacher avec soin. Les mettre à macérer pendant quelques heures dans un litre d'eau. Faire cuire à

petit feu pendant un quart d'heure (pour coaguler les albuminoïdes) en agitant avec une baguette de verre (pour que ces albuminoïdes ne collent pas au fond du vase). Passer sur un linge et exprimer. Ajouter 10 grammes de peptone et 5 grammes de sel marin et faire bouillir un instant, en agitant toujours, de façon à activer la dissolution de la peptone et du sel. Dès que celle-ci est accomplie, filtrer à chaud sur un papier filtre mouillé (pour arrêter les matières grasses) et alcaliniser légèrement avec une solution de soude à 1/10 (les auteurs allemands préfèrent le carbonate de soude). Verser dans un pot à lait en fonte émaillée et mettre à l'autoclave, en ayant soin de recouvrir d'une compresse. Chauffer un quart d'heure à 115° pour précipiter les sels terreux. Filtrer à chaud et répartir, suivant le cas, en ballons ou en tubes à essai. Stériliser un quart d'heure à 110° à l'autoclave. Il est important, pour obtenir un bouillon parfaitement clair, de faire la seconde stérilisation à une température inférieure à celle de la première, afin d'éviter une nouvelle précipitation de sels terreux. Lorsqu'on désire obtenir un riche développement microbien, ou bien encore lors de la préparation des toxines, il y a intérêt à se servir d'un bouillon peptonisé à 2 pour 100.

Les bouillons de rate, de foie, de poumon, etc., se préparent comme le bouillon ordinaire, en remplaçant la chair musculaire par l'un quelconque de ces parenchymes. Ces bouillons sont d'ordinaire, avons-nous dit, moins transparents que les bouillons de muscle. Quelques précautions qu'on prenne, ils conservent le plus souvent un léger louche. Filtrés à la bougie, ils passent clairs, puis redeviennent opalins.

2. Bouillon Martin. — Ce bouillon offre deux avantages : il contient une grande quantité de peptone, obtenue facilement et à peu de frais par autodigestion

de l'estomac de porc et il ne contient pas de sucre, grâce à l'altération légère de la viande, dont on ajoute les principes solubles à ceux qui proviennent de la solution peptonisée.

Ces avantages sont tels que, primitivement destiné à la culture du b. de Löffler, le bouillon Martin a ensuite été appliqué à celle d'un grand nombre de micro-organismes. Il permet même de cultiver le microbe de la péripneumonie, alors qu'on échoue en employant les peptones ordinaires. Nous conseillons de le préparer de la façon suivante pour les usages courants (une autre méthode, plus longue, sera indiquée à propos de la toxine diphtérique) :

On hache 500 grammes de viande et on les fait macérer dans un litre d'eau, à froid, pendant 24 heures. Le mélange est ensuite mis à l'étuve pendant quelques heures ; il fermente et les sucres sont ainsi éliminés. On a pesé, d'autre part, 200 grammes d'estomac de porc que l'on a haché finement et fait digérer pendant 24 heures à 50° dans un litre d'eau additionné de 10 cmc d'acide chlorhydrique, à 16° Baumé (contenant $2^{gr},48$ HCl gazeux par litre). La macération de viande est passée sur de l'ouate hydrophile, alcalinisée légèrement et salée à 0,5 pour 100 ; la macération d'estomac est filtrée à travers un linge ; on les incorpore l'une à l'autre. Si la réaction du mélange est encore légèrement acide on alcalinise à nouveau, puis on porte à l'autoclave un quart d'heure à 115°. Si la quantité de bouillon dépassait un litre, on stériliserait pendant autant de quarts d'heure qu'il y a de litres de liquide. On filtre sur papier Chardin, on répartit en tubes à essai et on porte un quart d'heure à 110°. Ici encore, si la quantité de bouillon dépassait un litre, on prolongerait la stérilisation pendant autant de quarts d'heure qu'il y aurait de litres de liquide. Cette recommandation s'applique à tous

les liquides nutritifs (*a fortiori* aux liquides visqueux). D'une façon générale, d'ailleurs, il faut, toutes les fois que cela est possible, ne pas opérer sur des volumes trop grands. Le bouillon Martin est souvent un peu louche. Pour l'éclaircir, M. Martin conseille d'ajouter, après le premier chauffage, un fragment de chlorure de calcium puis un morceau de phosphate de soude.

3. Macération de viande. — Hacher 500 grammes de viande de bœuf et les faire macérer à froid dans un litre d'eau pendant quelques heures. Passer à travers un linge et exprimer. Filtrer sur du papier. Ajouter un demi pour 100 de sel. Alcaliniser et stériliser par filtration. Cette macération a l'inconvénient de filtrer difficilement et de se troubler à l'étuve. Aussi M. Roux préfère-t-il la chauffer à 60° avant la filtration. Celle-ci se trouve ainsi grandement facilitée par une coagulation partielle des albuminoïdes et en même temps on constate que le milieu demeure clair à 37°.

4. Bouillon de poisson. — Se prépare comme le bouillon ordinaire, mais doit se faire autant que possible avec de l'eau de mer.

5. Solution de peptone (1 pour 100). — Dans un litre d'eau, jeter 10 grammes de peptone Chapoteaut et 5 grammes de sel marin. Faire dissoudre, en portant à l'ébullition dans une casserole. Filtrer. Répartir en tubes et stériliser. On sait que, pour la recherche de l'indol par exemple, la solution de peptone doit être préférée au bouillon peptonisé.

6. Bouillons additionnés de diverses substances. — On emploie souvent en technique bactériologique du bouillon additionné de substances variées. Quelques-unes de ces substances sont susceptibles de s'altérer par la chaleur (sang, sérum par exemple) ou de réagir à chaud sur les milieux auxquels elles sont

incorporées (acides) ; on les ajoute après la stérilisation, en prenant les précautions nécessaires pour ne pas infecter le liquide. C'est également après la stérilisation que devrait se faire rigoureusement l'addition des sucres. Néanmoins il n'y a pas grand inconvénient à les ajouter en même temps que la peptone et le sel. C'est ainsi que l'on opère, bien entendu, pour les produits qui résistent à la chaleur et ne modifient pas le milieu (glycérine). Parmi les milieux combinés à base de bouillon, nous devons mentionner :

1° *Le bouillon sérum,* obtenu généralement en mélangeant une partie de sérum à 2 parties de bouillon peptonisé. Le gonocoque, le microbe de la péripneumonie, etc., ne vivent que dans les milieux additionnés de sérum. Le streptocoque, d'après M. Marmorek, y conserve longtemps sa virulence. Cependant certains pathogènes, le vibrion cholérique par exemple, n'aiment guère les milieux-sérum. Le sérum humain peut être remplacé avantageusement par du liquide ascitique ou pleurétique.

2° *Bouillon additionné de sang* (humain, ou appartenant à diverses espèces animales). On sait que le cocco-bacille de Pfeiffer se développe avec élection dans les bouillons additionnés de sang. Le pneumocoque préfère, lui aussi, les milieux- sang aux milieux-sérum.

3° *Les bouillons glycérinés* (4 pour 100) *sucrés* (glucose, lactose, etc., 0,5 à 2 pour 100) à la fois *glycérinés et sucrés,* applicables surtout à la culture du bacille de la tuberculose et des streptothricées en général. Il y a souvent avantage à additionner les bouillons sucrés de teinture de tournesol bleue. En virant au rouge, elle indiquera le début de la fermentation des sucres, laquelle s'accompagne toujours de production d'acides.

4° *Les bouillons additionnés d'acides* divers, pour la culture des levures, des moisissures, du b. coli et du b. d'Eberth.

5° *Les bouillons sucrés et carbonatés*, applicables à l'étude du pouvoir fermentatif des microbes. On prépare par exemple un bouillon lactosé ou glucosé à 1 ou 2 pour 100 et on le répartit en tubes à essai. Chaque tube a reçu au préalable une petite pincée de carbonate de chaux. Le tout est stérilisé à l'autoclave à 110°. Il est préférable encore de stériliser au four Pasteur les tubes contenant le carbonate de chaux, et de les remplir une fois refroidis avec la solution sucrée.

7. Provisions de bouillon. — Quel que soit le bouillon choisi, on a souvent avantage à en préparer à la fois une certaine quantité. Mais la répartition de tout ce bouillon en tubes à essai présenterait le double désavantage d'immobiliser un grand nombre de tubes et de favoriser l'évaporation. On pare à ces inconvénients en constituant une provision de bouillon. Celui-ci sera donc réparti pour la plus faible portion en tubes à essai et pour la plus grande dans des ballons qui, après stérilisation à l'autoclave, seront maintenus bouchés à l'ouate et recouverts d'un cornet de papier (ou, mieux encore, scellés au-dessus du coton, pour éviter les modifications de composition dues à l'action de l'air). Au moment du besoin, le bouillon est transvasé purement à l'aide d'un ballon pipette Chamberland dans des tubes à essai stérilisés, et l'on éprouve ensuite le milieu par un séjour à l'étuve. Plus simplement, le bouillon est mis en tubes sans précautions d'asepsie et l'on pratique une nouvelle stérilisation à 110°.

8. Caractères des cultures en bouillon. — Nous devons, pour terminer, dire un mot des caractères des cultures en bouillon, ainsi que des modifications que

les bactéries font subir à ce milieu nutritif. Certains microbes troublent le bouillon. Ce trouble est parfois peu accusé (b. du rouget); d'autres fois il se traduit par la production de véritables ondes soyeuses, lorsqu'on vient à agiter le tube (b. de la morve); enfin il peut être plus intense encore (staphylocoque). Il arrive ailleurs que, le bouillon demeurant clair ou non, le microbe se développe à sa surface, sous forme d'un voile mince (vibrion du choléra), épais (b. pyocyanique) et même plissé (b. subtilis). C'est là une preuve manifeste d'aérobiose. Pour le b. subtilis et pour certains vibrions, le développement est exclusivement superficiel. D'autres fois, le bouillon demeurant clair, les organismes forment de petits flocons blanchâtres qui se déposent sur les parois et le fond du tube (streptocoque, b. du charbon) ou demeurent en suspension (b. de la peste). Quelle que soit la modalité suivant laquelle la culture s'est développée, les microbes finissent par tomber le plus souvent au fond du vase et, au-dessus d'eux, le bouillon, s'il était troublé, se clarifie. La culture des microbes en bouillon s'accompagne souvent de modifications dans la réaction de celui-ci. Tous les organismes qui donnent des voiles superficiels alcalinisent le milieu. Lorsque le bouillon contient des sucres, les microbes susceptibles de faire fermenter ceux-ci déterminent au contraire l'acidification. Il s'établit parfois une sorte de conflit entre ces deux réactions. C'est ainsi que le b. de Löffler acidifie d'abord et alcalinise ensuite, quand son développement se poursuit normalement en bouillon *ordinaire* (c'est-à-dire sucré). Citons encore les modifications de coloration (les vieilles cultures du bacille d'Eberth prennent un aspect rougeâtre) et de consistance. M. Malvoz a montré que, si on agite continuellement les cultures de la bactéridie charbonneuse, elles deviennent vis-

queuses après un ou deux passages. On sait enfin que les cultures des bactéries des nodosités des légumineuses s'épaississent très rapidement d'elles-mêmes.

C. Liquides organiques naturels.

Nous en distrairons le sérum, qui sera étudié à part (chap. VI.)

1° **Lait.** — Le lait de vache convient à la culture d'un grand nombre de micro-organismes. Il contient environ 13 pour 100 de résidu fixe, dont 4 pour 100 d'albuminoïdes, formés pour la grande partie de caséine ; 4 pour 100 de lactose ; 4 pour 100 de matière grasse et 0,8 pour 100 de sels. Il est coagulable par les acides et par la présure. La précipitation de la caséine dans la fermentation lactique est due au dédoublement du lactose en acide lactique. Quant à la coagulation par la présure, elle se produit en milieu neutre et même alcalin. D'où deux variétés d'action des microbes sur le lait. La caséine, coagulée par les microbes qui forment de la présure, peut être ensuite redissoute. Cela tient à la sécrétion de caséase, ferment protéolytique encore incomplètement étudié dans ses rapports avec les diastases voisines. Lorsqu'on veut utiliser le lait comme milieu de culture, on peut se contenter, après l'avoir écrémé, de le répartir en tubes à essai, de boucher à l'ouate et de stériliser à l'autoclave à 110°. Cette façon de procéder a l'inconvénient de produire des modifications assez sensibles dans la composition du liquide. On peut tourner la difficulté en stérilisant le milieu à 55°-58° par la méthode de Tyndall ou à 70° par la pasteurisation. Mais il est préférable de recueillir le lait aseptiquement au moment de la traite dans des tubes à essai stériles (Duclaux). Le pis de la vache

est alors nettoyé avec le plus grand soin à la brosse et au savon ; il est lavé au sublimé ; l'excès de sublimé est chassé à l'alcool et l'excès d'alcool à l'éther. Une personne, dont les mains ont été pareillement aseptisées, commence la traite. Les premiers jets, toujours chargés de germes, ainsi qu'on le sait, sont rejetés. Une deuxième personne flambe le tampon de coton et l'extrémité supérieure d'un tube à essai stérilisé. Elle présente ce tube, sous une légère obliquité, à l'orifice du trayon. Elle le retire dès qu'il est rempli environ à trois travers de doigt, le bouche et passe au suivant. Quelles que soient les précautions prises, on n'est jamais assuré qu'au cours de cette opération aucun germe n'ait réussi à contaminer le lait. Il est donc indispensable d'éprouver les tubes par un séjour d'une bonne semaine à l'étuve. Ajoutons que, pour un certain nombre d'auteurs, le lait cru présenterait l'inconvénient d'être bactéricide à l'égard de divers microbes ; cette propriété se manifesterait surtout lorsque les ensemencements ont été pratiqués peu abondamment.

Un certain nombre de micro-organismes coagulent le lait et on est averti de cette façon que la culture est positive. Pour savoir si cette coagulation est due à la formation d'acide ou à la sécrétion de présure on additionnera avantageusement le lait de teinture bleue de tournesol. Dans le premier cas seul la couleur virera au rouge. Elle virera aussi au rouge dans certains cas où l'acidité n'est pas suffisante pour déterminer la coagulation ; c'est encore là un indice précieux. Quand le lait n'est modifié ni dans son aspect ni dans sa réaction, on est obligé, pour s'assurer qu'il s'est bien produit un développement, de pratiquer un examen microscopique ou de faire un passage en bouillon ; c'est un sérieux inconvénient. Les organismes capables de produire la

fermentation lactique sont très nombreux ; à côté du bacille de Pasteur et de Hueppe, il faut citer de nombreux microbes, isolés des eaux et de l'air par M. Miquel et par d'autres auteurs, et chez lesquels la production d'acide lactique est l'acte physiologique dominant. Avec beaucoup d'autres espèces, le b. coli et quelques-uns des microbes du même groupe, les vibrions cholériques et certains organismes similaires, etc..., la coagulation du lait se manifeste également, mais comme acte physiologique accessoire. On doit savoir que certains coli-bacilles ne coagulent le lait qu'en grande surface et le laissent liquide en couche profonde (Etienne). La bactéridie charbonneuse, par contre, ne coagule le lait qu'en couche élevée (Roger). Nombre d'organismes (producteurs de présure et de caséase) redissolvent, avons-nous dit, le caillot qu'ils ont formé (tyrothrix tenuis, b. subtilis, b. pyocyanique, etc.).

On emploie quelquefois le *petit lait* comme milieu de culture. Petruschky le prépare en chauffant à une douce chaleur, du lait additionné d'un peu d'une solution étendue d'acide chlorhydrique. Il filtre, neutralise et stérilise. Le petit lait sera avantageusement additionné, lui aussi, de teinture bleue de tournesol.

2° **Œufs**. — Les œufs sont parfois usités comme milieux nutritifs. Ils ont été appliqués par Hüppe à l'étude des vibrions cholériques. On sait qu'ils ne sont pas toujours aseptiques. Ils peuvent avoir été pondus infectés, les microbes remontant dans l'oviducte avant la sécrétion de la coquille, ainsi que l'a démontré M. Gayon. Conservés dans un endroit humide, ils peuvent aussi s'infecter secondairement, les moisissures et même les bactéries pénétrant à travers la coquille (Wilm). Il existe différentes façons d'utiliser l'œuf en bactériologie ; tantôt on fait usage séparément soit

du jaune, soit de l'albumine liquide, tantôt on réalise la culture dans l'œuf même. Dans ce dernier cas, on prend un œuf très frais et tantôt on l'agite violemment de façon à mélanger intimement le jaune et le blanc, tantôt on le laisse intact. On flambe fortement la grosse extrémité et on y pratique un petit orifice à l'aide d'une pince fine rougie au feu. Par cet orifice, on fait pénétrer l'extrémité d'une pipette ou d'un fil de platine chargés de semence. L'orifice est ensuite obturé à la cire Golaz. Si on désire utiliser uniquement l'albumine liquide, on flambe et on perfore l'œuf de la façon indiquée. On a soin de pratiquer un orifice assez volumineux, par lequel l'on introduira l'extrémité d'une grosse pipette à boule. On aspirera alors avec soin toute l'albumine, sans entraîner le jaune. Le blanc d'œuf sera ensuite transvasé dans des tubes à essai stérilisés. Il pourra être usité soit liquide, soit coagulé à 68° comme le sérum, soit même plus simplement coagulé à 100°. L'albumine liquide peut être aussi incorporée à du bouillon, ou stérilisée après avoir été étendue de 3 parties d'eau, ce qui la rend incoagulable par la chaleur.

Le jaune sera usité de même soit à l'état naturel, soit sous la forme suivante (Nastiukoff)

Jaune d'œuf.	100 centimètres cubes.
Eau distillée.	1 litre.
Soude à 10 pour 100. . .	5 centimètres cubes.

Dans certains cas enfin, les œufs sont employés cuits. Voici comment on prépare ce milieu solide, trop peu important pour être remis au chapitre suivant. Faire durcir un œuf dans l'eau bouillante. Enlever la coquille. Découper en tranches perpendiculaires au grand axe, avec un couteau propre, de façon à ne pas noircir la surface. Mettre les rondelles

ainsi obtenues en boîtes de Pétri et stériliser celles-ci, entourées de papier filtre, à l'autoclave à 110°.

3° **Humeur aqueuse.** — Rarement usitée aujourd'hui en technique bactériologique, l'humeur aqueuse présente, au point de vue historique, une importance assez grande. On sait que c'est en cultivant la bactéridie charbonneuse, en goutte suspendue, dans de l'humeur aqueuse de lapin que Koch découvrit le cycle évolutif de ce micro-organisme. Aux yeux de lapin, on préférera les yeux de bœuf ou de cheval, qui fourniront une quantité plus considérable de milieu nutritif. Lorsqu'on s'est procuré des yeux très frais, on cautérise la surface de la cornée à l'aide d'un fer rouge et, au travers de l'escarre, on fait pénétrer dans la chambre antérieure l'extrémité flambée d'une pipette stérile, en imprimant à celle-ci un mouvement de vrille continu et sans secousse. L'humeur aqueuse monte d'elle-même. Lorsque la pipette est remplie, on la scelle, ou bien on en transvase le contenu dans un tube à essai préalablement stérilisé. Dans le cas où on voudrait absolument se servir de l'humeur aqueuse du lapin, on prélèvera celle-ci *in vivo*, après avoir bien lavé la conjonctive à l'eau stérilisée. Une pipette à effilure très fine sera introduite, sans cautérisation préalable, dans la chambre antérieure. Après quelques heures, l'humeur aqueuse s'est déjà reformée et on peut recommencer l'opération sans danger.

4° **Sang.** — Les milieux à base de sang ont une grande importance en technique bactériologique. Un certain nombre de micro-organismes, qui ne se développent pas dans les milieux ordinaires, y poussent très bien. Nous citerons comme exemples le gonocoque, le b. de Pfeiffer et le b. de Koch. M. Spronck a même affirmé jadis qu'il avait réussi à cultiver le bacille de la lèpre sur ces milieux, mais, en l'absence d'un nouveau travail de sa part et de recherches confir-

matives de la part des autres auteurs, il convient de faire les plus expresses réserves. Ce sont enfin ces milieux qui ont permis récemment d'obtenir pour la première fois des cultures du streptobacille de Ducrey (Besançon, Griffon et Le Sourd).

Le sang peut être utilisé de deux façons : à l'état de sang complet ou à l'état de sérum. Nous ne parlerons ici que du premier cas.

On sait qu'aussitôt sorti des vaisseaux le sang se coagule, et on conçoit qu'il y ait là un obstacle à son emploi comme milieu de culture. La difficulté peut être tournée par l'usage du sang défibriné ou rendu incoagulable. On défibrine le sang en le battant pendant 10 minutes avec des perles de verre ou un fil de fer enroulé. On le rend incoagulable au moyen, soit des protéoses que contient la peptone Witte, soit des têtes de sangsues, soit encore de certains sels. Étudions séparément ces divers procédés.

Les propriétés anticoagulantes des protéoses ne sont utilisées qu'*in vivo*. On pourrait, à la rigueur, incorporer à une solution de peptone Witte du sang obtenu purement. Ce procédé est peu pratique. Il exige en effet des doses de protéoses 15 fois supérieures à celles que nécessite la méthode suivante. On injectera rapidement dans les veines d'un chien une solution à 10 pour 100, en eau physiologique, de peptone Witte ($0^{gr},3$ par kilogramme d'animal) ; le sang et la lymphe sont ainsi rendus incoagulables pendant deux heures. La durée de la période d'incoagulabilité est d'autant plus longue que la solution est plus riche en protéoses et que l'injection a été poussée plus rapidement. L'injection dans le péritoine demeure sans effet. Au lieu de protéoses, on pourrait recourir aux gélatoses ou aux caséoses. Il faut savoir que le sang de certains chiens se montre jusqu'à un certain point réfractaire à l'ac-

tion des substances anticoagulantes. Cette immunité est du reste fort rare et toujours incomplète. Le chat pourrait être employé, mais il présente l'inconvénient d'un maniement difficile. Le lapin convient assez mal ; il faut employer chez lui des doses quasi-mortelles de protéoses et encore n'obtient-on qu'un simple retard dans la coagulation. Le sang peptoné finit toujours par se coaguler à la longue.

Les propriétés anticoagulantes de l'extrait de sangsue ont été démontrées par Haycraft. Le sang rendu ainsi incoagulable a été employé comme milieu nutritif par MM. Bosc et Delezenne. Les têtes de sangsues sont durcies pendant quelques jours dans de l'alcool fort. Puis elles sont desséchées et broyées. On les fait bouillir dans de l'eau à raison d'une tête pour 5 ou 10 centimètres cubes ; on filtre et on répartit le filtrat dans des tubes stériles, qu'on porte à 105° pendant 5 minutes. Chaque tube reçoit ensuite de 10 à 20 centimètres cubes de sang, puisé purement dans les vaisseaux d'un animal. L'extrait de sangsue agit sur le sang de tous les mammifères. Celui-ci néanmoins finit toujours par se coaguler à la longue. Un autre procédé, moins commode, consiste à rendre le sang incoagulable chez l'animal même en lui injectant, dans le système veineux, et par kilogramme de poids du corps, une quantité de liquide représentant deux têtes de sangsues.

Certains sels, le citrate neutre de soude en particulier, permettent également d'obtenir du sang incoagulable. Le citrate s'emploie exclusivement *in vitro* et à la dose de 3 pour 1000. On sait que les décalcifiants (oxalate neutre de potasse à 1 pour 1000 par exemple) jouissent aussi du pouvoir anticoagulant.

Le sang, défibriné ou maintenu liquide, peut être employé soit pur, soit mélangé à du bouillon, du liquide d'ascite, etc. On peut aussi, comme nous le

verrons, l'incorporer à de la gélose, l'étaler à sa surface, etc. Notons que lorsque le sang n'est pas utilisé pur, il est ordinairement inutile de le défibriner ou de le rendre incoagulable.

5° **Urine.** — Très employée comme milieu nutritif dans les premiers temps de la bactériologie (par Pasteur notamment, pour cultiver la b. charbonneuse), l'urine est bien délaissée aujourd'hui. On peut, après l'avoir ou non alcalinisée, la stériliser à la bougie Chamberland ; c'est le meilleur moyen. On peut aussi stériliser une sonde enveloppée de papier, désinfecter avec grand soin le gland et le méat, et l'introduire dans l'urètre avec des mains parfaitement aseptisées. La sonde a été enduite préalablement d'huile stérilisée. L'urine est reçue dans un ballon flambé, alcalinisée ou non, et répartie dans des tubes à essai. Ces tubes sont éprouvés par un séjour à l'étuve.

CHAPITRE V

MILIEUX SOLIDES

Nous étudierons d'une part les milieux liquides solidifiés, d'autre part les milieux solides proprement dits, lesquels se résument presque exclusivement au point de vue pratique dans les pommes de terre.

I. *Milieux liquides solidifiés.*

Ils comprennent la gélatine, la gélose, les gelées de lichen et les milieux à base de gomme adragante. Le sérum coagulé sera décrit plus tard (chap. VI).

A. **Gélatine.**

1° Généralités. — La gélatine est très employée en technique bactériologique. Elle diffère, comme on sait, des autres matières albuminoïdes en ce qu'elle ne donne ni la réaction de Millon, ni la réaction xanthoprotéique et en ce qu'elle ne fournit pas de tyrosine par décomposition. Les avantages qu'elle présente sont multiples. Elle est transparente et se prête à la solidification de tous les milieux liquides. Elle est liquéfiée par certains microbes, ce qui constitue entre les organismes un caractère différentiel important. Les ferments protéolytiques sécrétés par les microbes la transforment d'abord en gélatoses (proto et deutéro-gélatose, comparables aux proto et

deutéro-albumoses) puis en gélatine-peptone (comparable aux peptones).

En regard de ces avantages, la gélatine présente un grand inconvénient. La gélatine classique (bouillon peptonisé et salé additionné de 10 pour 100 de gélatine) fond vers 23-24°, c'est-à-dire à une température inférieure d'une part à celle du corps humain, de l'autre à celle de l'été dans les régions tempérées et de la plus grande partie de l'année dans les pays chauds. Tous ceux qui ont cherché à pratiquer pendant la saison chaude des analyses sur milieux gélatinés, des analyses d'eau en particulier, connaissent les ennuis qui résultent de cette facile liquéfaction. Ils savent aussi que la gélatine n'est avantageusement remplacée, ni par la gélose, ni par le mélange de gélose et de la gélatine. Ils nous sauront gré de nous étendre sur les procédés qui permettent d'élever le point de liquéfaction de la gélatine. Nous empruntons en partie ces notions à des recherches inédites entreprises par l'un de nous en collaboration avec le Dr Scouros. Les conditions qui influent sur le point de fusion d'une gélatine sont :

1° La variété commerciale, c'est-à-dire en dernière analyse, l'origine et le mode de préparation. Il existe à cet égard, entre les diverses marques, des différences très notables (nos recherches comparatives ont porté sur des produits français, anglais et allemands au nombre de 12). La gélatine « Comète extra-fine », que fournit la maison Cogit, est de beaucoup celle qui donne les résultats les plus satisfaisants ; ces résultats sont constants, quelque soit le lot considéré.

2° Les substances qu'on ajoute à la gélatine pour en faire un milieu nutritif. Entre le bouillon de viande et l'eau peptonisée, les différences ne sont pas très considérables. Elles sont toujours cependant à l'avantage du bouillon.

3° Le chauffage. Surtout au-dessus de 100°, il abaisse rapidement le point de fusion de la gélatine. C'est pour cette raison que M. Roux stérilise ce milieu par la méthode de Tyndall, en le chauffant trois jours de suite un quart d'heure à 100°. M. Pekelharing va plus loin, et conseille de ne pas dépasser 80° ni dans la fabrication ni dans la stérilisation du milieu. M. Chamberland a proposé dans le même but de stériliser la gélatine par filtration. Toutefois, même au bain-marie, la filtration sur la bougie Chamberland est très pénible. Elle l'est un peu moins avec la bougie Berkefeld. Les températures élevées agissent d'autant plus énergiquement qu'elles sont plus prolongées ; à 100°, le point de fusion est abaissé de 2° environ par heure ; au-dessus de 100°, la chute est plus rapide dans le même temps (van der Haide). Remarquons toutefois que si l'on conserve au froid la gélatine avant de l'employer, on fait remonter très sensiblement le point de fusion (3° environ).

4° La proportion même de gélatine. En élevant cette proportion jusqu'à 25 pour 100, M. Elsner a vu que le milieu pouvait résister à 28°-29°. La gélatine préparée à 80° à l'aide de la marque « Comète extra-fine » résiste, d'après nos recherches, à :

31	degrés si la proportion de gélatine est de	10	pour 100
32	— —	15	—
32,5	— —	20	—

(Moyenne de nombreuses expériences.)

La gélatine préparée à l'aide de la méthode rapide (*ubi infra*), en se servant de la même marque, résiste à :

28	degrés si la proportion de gélatine est de	10	pour 100
29,5	— —	15	—
30	— —	20	—

(Moyenne de nombreuses expériences.)

Les gélatines concentrées sont difficiles à stériliser (elles peuvent s'échapper hors des vases, comme la gélose), à filtrer, et même à répartir en tubes. Les cultures qu'elles fournissent sont moins caractéristiques que celles qu'on obtient avec les gélatines plus étendues. Les chiffres précédents montrent d'ailleurs qu'on gagne peu à élever la dose de gélatine.

En résumé, nous conseillons de s'en tenir pendant la saison froide à la gélatine à 10 pour cent, préparée d'après une des deux méthodes suivantes (nous préférons le procédé rapide, plus commode); de faire usage pendant la saison chaude de gélatine à 15 pour 100 ; et de recourir au procédé de Pekelharing dans le cas où l'on voudra obtenir un milieu extra-résistant. On donnera toujours la préférence à la marque « Comète extra-fine ».

2° Gélatine classique. — *a*) **Préparation et distribution.** — Nous décrirons deux modes de préparation de la gélatine.

1° *Préparation par la méthode de M. Roux.* — On fait macérer pendant quelques heures 500 grammes de viande dans un litre d'eau. On passe sur un linge et on exprime. On ajoute au jus de viande 10 grammes de peptone, 5 grammes de sel marin et 100 grammes de gélatine coupée en petits morceaux. On chauffe, au-dessous de 60°, au bain-marie dans un pot à lait en tôle émaillée, qui plonge dans une casserolle remplie d'eau (le doigt indique suffisamment la température), jusqu'à ce que toute la gélatine soit dissoute. On alcalinise modérément et ici se trouve le point délicat de la préparation. Si on alcalinise trop, la gélatine ne fait plus prise par le refroidissement et si on alcalinise trop peu, elle passe trouble à la filtration. Le meilleur procédé consiste, d'après nous, à alcaliniser jusqu'à coloration rose à la phénolphtaléine, puis à ajouter 2

pour 100 d'une solution demi-normale d'acide chlorhydrique. On obtient ainsi une réaction correspondant à la teinte franchement violette du bon tournesol. Ce mode d'alcalinisation s'applique d'ailleurs à la majorité des milieux de culture. La gélatine étant alcalinisée, on la chauffe une heure à 100° dans l'autoclave, le robinet restant ouvert. L'albumine de la macération de

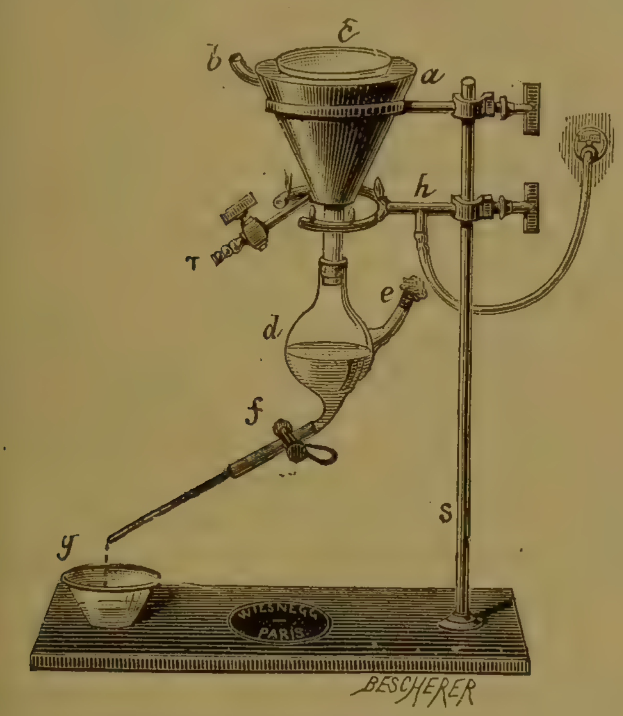


Fig. 66. — Entonnoir à filtration chaude.

viande clarifie le milieu, en produisant un coagulum brunâtre à sa surface ; si ce coagulum se forme mal, la gélatine obtenue est trouble ; il faut alors laisser refroidir à 55°, ajouter un blanc d'œuf délayé dans 50 centimètres cubes d'eau et chauffer de nouveau à 100° pendant un quart d'heure. On filtre sur papier à filtre ordinaire, dans un entonnoir à filtration chaude, tel par exemple que celui qui est repré-

senté sur la figure ci-jointe (fig. 66); si l'on n'en possède pas, on peut se contenter de filtrer dans l'autoclave allumé et ouvert (c'est-à-dire dans la vapeur d'eau à 100°). Au reste, une gélatine bien faite filtre à la température ambiante, à moins que celle-ci ne soit trop basse. On répartit dans des tubes ou des vases de culture flambés au four Pasteur, et on stérilise trois jours de suite un quart d'heure à 100° dans l'autoclave (dont le robinet reste ouvert).

2° *Préparation par la méthode rapide.* — La macération de viande, additionnée de peptone, de sel, de gélatine, puis alcalinisée comme dans le procédé précédent, est portée un quart d'heure à 115°. On filtre, on répartit dans des vases non stériles et on chauffe un quart d'heure à 110°.

Au lieu de partir de la macération de viande, on peut partir du bouillon. On dissout au bain-marie 100 grammes de gélatine dans un litre de bouillon. On alcalinise (il faut se rappeler que les gélatines du commerce sont toujours très acides) et on ajoute, après refroidissement à 55°, un blanc d'œuf délayé dans 50 centimètres cubes d'eau. On porte un quart d'heure à 115°. On filtre, on répartit et on stérilise un quart d'heure à 110°.

Lorsqu'on répartit la gélatine dans des tubes ou des ballons, il faut avoir soin de ne pas souiller leurs orifices, sans quoi le milieu ferait coller les tampons de coton, ce qui gênerait beaucoup les ensemencements. On se servira avec avantage, pour les distributions, d'un entonnoir en verre muni d'un tube de caoutchouc; ce tube porte une pince à pression continue et se termine par une courte pipette effilée. On verse la gélatine dans l'entonnoir et après avoir introduit la pipette dans chaque tube, on règle l'écoulement du liquide à l'aide de la pince.

La gélatine s'emploie inclinée ou (dans la majorité des cas) non inclinée. Pendant la solidification qui suit le dernier passage à l'autoclave, les tubes seront donc disposés soit debout, soit couchés sur une règle ou une baguette de verre. Les premiers serviront aux ensemencements par piqûre et à la séparation en boîtes de Petri et en tubes d'Esmarch, les seconds aux ensemencements en strie. Les uns et les autres seront, pour éviter la dessiccation du milieu, munis d'un capuchon de caoutchouc. On versera dans les tubes une quantité variable de gélatine, selon l'usage qu'on en veut faire : 1/2 travers de doigt (tubes d'Esmarch) — 2 travers de doigt (boîtes de Pétri) — 3 travers de doigt (cultures par piqûre et gélatine inclinée) — 4 travers de doigt (cultures en couche haute — anaérobies).

b) **Caractères des cultures dans la gélatine.** — La gélatine se prête à la culture d'un grand nombre de micro-organismes. Ceux-ci peuvent se diviser en deux groupes, suivant qu'ils liquéfient ou non le milieu nutritif. Les microbes qui ne liquéfient pas la gélatine forment à sa surface (culture en strie) ou dans son épaisseur (ensemencement par piqûre) tantôt une traînée légère (b. d'Eberth), tantôt un enduit épais, (b. coli). Lorsque la gélatine est liquéfiée, elle l'est tantôt rapidement (vibrion de Finkler-Prior), tantôt au contraire plus ou moins lentement (b. charbonneuse — b. subtilis). Pour plusieurs espèces, le mode de liquéfaction de la gélatine est assez caractéristique (vibrions cholériques). Certains microbes, ensemencés par piqûre, donnent naissance à des arborisations (b. anthracis) ou à des flocons (vibrion septique) également caractéristiques. Ajoutons que le développement de quelques espèces est très faible en gélatine (b. de la morve — b. de Löffler) et même nul (pneumocoque). En raison de la température

relativement basse à laquelle elle fond, la gélatine convient ordinairement mieux à la culture des saprophytes (microbes de l'eau ; microbes du sol..., etc.) qu'à celle des pathogènes.

3° GÉLATINES DIVERSES. — La gélatine est employée en technique bactériologique sous des formes très différentes. On peut gélatiniser non seulement le bouillon, mais encore l'urine, le sérum, le petit lait..., etc. On peut gélatiniser un bouillon glycériné (*gélatine pepto-glycérinée*), un bouillon glyco-glycériné (*gélatine pepto-glyco-glycérinée*)..., etc. *La gélatine au bouillon de poisson,* usitée pour l'étude des microbes phosphorescents, sera indiquée plus tard. *La gélatine au raisin* s'obtient en faisant cuire dans 100 grammes d'eau 25 grammes de raisins secs. On exprime ; on filtre, et on fait dissoudre 10 grammes de gélatine. On alcalinise légèrement ; on stérilise à 110° ; on filtre à nouveau et on répartit dans des tubes à essai qui sont stérilisés une dernière fois.

4° MILIEU D'ELSNER ET AUTRES GÉLATINES DESTINÉES A L'ISOLEMENT DU B. TYPHIQUE ET DES COLI-BACILLES. — Nous devons une mention spéciale au *milieu d'Elsner* ou « gélatine — pomme de terre — iodurée » très employé pour l'isolement des microbes du groupe coli-typhique, et à d'autres gélatines préconisées dans le même but.

a) *Milieu d'Elsner.* — La technique primitive d'Elsner a été modifiée par l'un de nous de la façon suivante :

Prendre 500 grammes de pommes de terre. Après les avoir lavées et brossées, les peler avec un couteau à lame d'argent ou de nickel et les râper avec un instrument de nickel ou un fragment de verre. La pulpe obtenue est mise à macérer dans un litre d'eau pendant 4 heures. On verse dans une serviette propre et on tord vigoureusement, de façon à exprimer tout

le suc. On filtre jusqu'à ce que le liquide passe à peu près clair. Ajouter 20 pour 100 de gélatine et faire dissoudre à feu doux. Essayer la réaction du liquide, qui est très acide, puis verser de la solution normale de soude jusqu'à ce que cette réaction devienne faiblement, mais encore nettement acide. Suivant le degré d'acidité, il faut de 20 à 30 centimètres cubes de la solution alcaline. Ajouter 10 grammes de KI. Porter à l'autoclave à 110°. Des matières albuminoïdes se précipitent en masse. On filtre à chaud jusqu'à ce que le liquide passe clair. On répartit en tubes à essai et on stérilise à 110°. Le milieu est prêt à servir. Ainsi constitué, il peut supporter sans se liquéfier une température de 23 à 25°. Le point de fusion pourrait être légèrement élevé en augmentant la proportion de gélatine. Au moment où elle est retirée de l'autoclave, la gélatine iodurée doit être limpide, transparente, de coloration jaune clair. Cette coloration brunira un peu par le refroidissement. Tout milieu qui serait louche ou noirâtre après la stérilisation devrait être rejeté.

b) *Milieu de Grimbert.* — Le grand inconvénient du milieu d'Elsner est le manque de fixité de sa composition, en rapport avec la grande différence de composition des pommes de terre. Pour parer à cet inconvénient, M. Grimbert a préconisé un suc de pommes de terre artificiel, dont la formule est la suivante :

Eau distillée.	1000
Maltose.	1
Amidon soluble.	2
Asparagine.	2
Phosphate neutre de potasse. . . .	2
Sulfate de potasse.	2
Sulfate de magnésie.	2
Bimalate d'ammoniaque.	2
Carbonate de magnésie.	1

Le liquide de Grimbert est additionné de 15 pour

100 de gélatine, qu'on fait dissoudre au bain-marie. Quand la dissolution est achevée, on laisse refroidir la masse à 55° et on ajoute un blanc d'œuf, battu dans un peu d'eau. Pour donner au milieu une réaction convenable et bien déterminée, voici comment on procède. A l'aide d'une pipette, on en prélève 10 centimètres cubes, qu'on dilue dans 50 centimètres cubes d'eau distillée et on ajoute 5 à 6 gouttes de solution alcoolique de phénol-phtaléine. On verse de l'eau de chaux avec une burette graduée jusqu'à ce qu'on obtienne une légère teinte rose persistante. S'il a fallu plus de 5 centimètres cubes d'eau de chaux pour neutraliser 10 centimètres cubes de gélatine, on additionne celle-ci d'un peu de solution normale de soude et on recommence le titrage. On continue à ajouter de la soude jusqu'à ce qu'on arrive à ne plus employer que 5 centimètres cubes d'eau de chaux pour neutraliser 10 centimètres cubes du milieu. La gélatine ainsi obtenue est portée à l'autoclave, filtrée, répartie en ballons ou en tubes et stérilisée à nouveau. Au moment d'en faire usage on introduira dans les ballons ou les tubes 1 pour 100 de KI.

c) *Gélatine à la fécule.* — C'est également pour obvier au manque de fixité dans la composition du milieu d'Elsner que Retout a tenté de remplacer la pulpe de pommes de terre par la fécule ordinaire du commerce. On fait macérer, pendant 24 heures, 25 grammes de fécule dans 100 grammes d'eau et on filtre. On prépare, avec ce macéré, une gélatine nutritive, en suivant point par point la technique d'Elsner. Le milieu obtenu, au lieu d'être légèrement coloré en brun, offre la teinte jaune pâle.

d) *Gélatine de Piorkowsky.* — On prend un litre d'une urine émise depuis 48 heures et présentant déjà la réaction alcaline. On fait dissoudre à chaud 5 grammes de peptone et 33 grammes de gélatine.

On refroidit à 55° et on ajoute un blanc d'œuf battu dans 50 grammes d'eau. On stérilise à l'autoclave à 115°; on répartit en tubes à essai et on stérilise de nouveau à 110°.

e) *Gélatine de Remy*. — Plus compliquée est la gélatine nouvellement décrite par Remy. On broie dans un mortier :

Asparagine.	6 grammes.
Acide oxalique.	0,50
Acide lactique..	0,15
Acide citrique..	0,15
Phosphate bisodique.. . .	5 grammes.
Sulfate de potasse. . . .	1,25
Chlorure de sodium. . . .	2

On introduit la poudre ainsi obtenue dans un matras avec un litre d'eau distillée et 30 grammes de peptone Witte, et on porte à l'autoclave pendant un quart d'heure. Dès que le matras a été retiré de l'autoclave, on en verse le contenu bouillant dans un autre ballon, lequel a reçu au préalable 120 à 130 grammes de gélatine (marque R.F.). On agite pour dissoudre celle-ci, puis on ajoute de la soude jusqu'à alcalinisation légère. On cuit à l'autoclave à 110° pendant un quart d'heure puis on acidifie avec une solution 1/2 normale d'acide sulfurique, de telle sorte que l'acidité de 10 centimètres cubes de gélatine disparaisse par addition de 0,2 centimètre cube de solution 1/2 normale de soude (ce qui correspond à 5 pour 1000 d'acide sulfurique). On fait bouillir un instant et on filtre. On vérifie l'acidité; on ajoute $2^{gr},50$ de sulfate de magnésie; on répartit à raison de 10 centimètres cubes de gélatine par tube et on stérilise à 100° en 3 séances. Au moment de l'emploi, on introduit dans chaque tube 1 centimètre cube d'une solution de lactose à 35 pour 100 et 0,1 centimètre cube d'une solution phéniquée à 2,5 pour 100.

B. Gélose.

1° **Généralités.** — La gélose est une substance cellulosique, extraite en 1854 par Payen, d'une algue très commune dans les mers d'Extrême-Orient, l'agar-agar. Elle se présente dans le commerce sous forme de filaments secs, parcheminés, de coloration grisâtre. Plongée dans l'eau, elle gonfle énormément et se transforme en une matière gélatineuse flexible. Les meilleures géloses sont celles qui proviennent des côtes de Ceylan et de Java.

La gélose, chauffée en présence des acides, se décompose en donnant naissance à un sucre incristallisable et, dit-on, infermentescible. Malgré le caractère soi-disant infermentescible de ce sucre, nous croyons qu'il importe de veiller avec soin à l'alcalinisation ou tout au moins à la neutralisation exacte des milieux à base de gélose.

La gélose jouit, comme la gélatine, du pouvoir de transformer les milieux liquides en milieux solides. Les milieux à base de gélose se prêtent comme les milieux à base de gélatine à l'addition d'un grand nombre de substances. Ils présentent l'inconvénient, d'ailleurs médiocre, de ne pouvoir être obtenus complètement transparents, et de garder toujours, quoi qu'on fasse, un léger louche. Enfin ils ne se liquéfient qu'à 65° et demeurent en surfusion jusqu'à 40°. Ils peuvent donc être mis à l'étuve à 37° et conviennent par conséquent à l'étude d'un grand nombre de micro-organismes, particulièrement de micro-organismes pathogènes. Ils sont faciles à transporter et peuvent être utilisés en toute saison et dans tous les pays. Ce sont de sérieux avantages. Le point de fusion des milieux à base de gélose peut encore être élevé en augmentant la proportion de cette substance (2 pour

100 par exemple, à la place de 1,5 pour 100). Ne pouvant être maintenue en surfusion au-dessous de 40°, la gélose doit être filtrée à chaud, ce qui nécessite l'emploi soit de l'autoclave, soit d'un entonnoir spécial. On se hâtera aussi pour la répartition en tubes à essai. Ce sont de petits inconvénients.

La gélose n'est pas, comme la gélatine, attaquée par un grand nombre d'organismes ; seuls, la liquéfient quelques microbes anaérobies susceptibles de digérer la cellulose. Il y a là à la fois un bon et un mauvais côté. Beaucoup d'isolements se trouvent, de ce fait, simplifiés, mais, d'une façon générale, l'aspect des colonies microbiennes est toujours moins caractéristique que dans la gélatine.

2° **Préparation et distribution de la gélose classique.** — On peut préparer la gélose en partant soit du bouillon, soit de la macération de viande.

1er *Cas.* — On dissout à chaud 20 grammes de gélatine dans un litre de bouillon. Le but de cette adjonction est de faciliter l'adhérence de la gélose à la paroi des tubes dans lesquels on la distribuera. On alcalinise légèrement, et on ajoute 15 grammes de gélose préalablement coupée en morceaux et, autant que possible, mise à gonfler dans l'eau pendant une heure ou deux. On fait dissoudre la gélose à la température de l'ébullition, en agitant avec une baguette de verre. On laisse refroidir à 55° et on ajoute un blanc d'œuf, délayé dans 50 centimètres cubes d'eau. On porte un quart d'heure à 120°. On filtre sur papier Chardin dans un entonnoir chauffé, ou plus simplement dans un entonnoir de verre mis à l'autoclave. On répartit rapidement dans des tubes à essai, en évitant, comme pour la gélatine, de souiller l'orifice des tubes. On stérilise les tubes à 110°, puis ils sont inclinés sur une règle ou une baguette de verre, relevés au bout de 48 heures, et

capuchonnés. Le mieux est de les déposer dans une étuve à 37°. De cette manière, les lamelles minces qui répondent aux bords de la couche de gélose se dessèchent et adhèrent à la paroi des tubes. Il arrive, sans cela, que la gélose se détache une fois le tube redressé, et l'ensemencement est ainsi rendu impossible. La mise à l'étuve est surtout indispensable quand on a des raisons pour ne pas ajouter de gélatine à la gélose.

Pour distribuer celle-ci, on en versera dans chaque tube la valeur de 3 travers de doigt. Quelquefois on aura besoin de « géloses droites », destinées, les unes à conserver les cultures (la piqûre en gélose constitue à cet égard un excellent moyen), les autres à ensemencer les anaérobies en couche haute. Dans le premier cas on versera 3 travers de doigt du milieu, dans le second 4.

2° *Cas.* — Ajouter à un litre de jus de viande 10 grammes de peptone, 5 grammes de sel marin et 20 grammes de gélatine. Porter à l'ébullition. Filtrer et alcaliniser légèrement. Ajouter 15 grammes de gélose coupée en morceaux et gonflée. Porter dans une casserole à la température de l'ébullition, etc..., en un mot, suivre, quant au reste, les différents temps de la manipulation précédente.

On saura qu'il est bon de ne jamais remplir qu'à moitié les vases qui servent à préparer la gélose. En raison de sa viscosité, celle-ci conserve longtemps une température supérieure à 100°. Aussi tend-elle toujours à s'échapper du récipient lorsqu'on ouvre le robinet de l'autoclave.

Lorsqu'on veut ajouter à la gélose préalablement stérilisée un volume marqué d'une substance, il est nécessaire d'augmenter sa concentration (cette recommandation est applicable, d'une façon générale, à tous

les milieux et, d'une façon spéciale, aux milieux gélifiables). Si, par exemple, on désire préparer de la gélose-sérum au 1/3, on emploiera de la gélose à 2 pour 100. Après avoir fait fondre à une haute température cette gélose, contenue dans des tubes, on la laisse refroidir au bain-marie jusqu'à 40° et on ajoute 1/3 de sérum, préalablement porté à 40°. Les tubes sont ensuite inclinés.

3° **Gélose-Gélatine.** — La gélose-gélatine est très employée l'été et dans les pays chauds, c'est-à-dire dans toutes les circonstances où la gélatine serait indiquée, mais où on craint sa liquéfaction. C'est cependant un assez mauvais milieu, très difficile à obtenir transparent. Un certain nombre de micro-organismes ne s'y développent pas ou s'y développent mal. Les colonies n'y ont aucun aspect caractéristique. La gélose-gélatine se prépare en faisant dissoudre, dans un litre de bouillon, 80 grammes de gélatine, en alcalinisant, et en ajoutant à ce moment 5 grammes de gélose. Faire dissoudre cette gélose. Laisser refroidir à 55°. Ajouter un blanc d'œuf. Stériliser. Répartir. Stériliser une dernière fois. Ce milieu peut supporter la température de l'étuve sans se liquéfier. Les microbes qui digèrent la gélatine le ramollissent plutôt qu'ils ne le liquéfient.

4° **Gélose de Tochtermann.** — Faire dissoudre, dans un litre d'eau, d'abord 10 grammes de peptone, 5 grammes de chlorure de sodium, et 3 à 5 grammes de glucose ; puis 20 grammes de gélose. Faire cuire un quart d'heure à 1/2 heure avec un litre de sérum de mouton. Filtrer, mettre en tubes et stériliser. On obtiendrait de la sorte un excellent milieu pour le diagnostic de la diphtérie, le bacille de Löffler poussant très rapidement et de façon très caractéristique à la surface des *plaques* préparées avec cette gélose (Tochtermann-Kempner).

5° **Gélose glycérinée. Gélose glycérinée et sucrée.** — Elles se préparent comme la gélose ordinaire, mais au lieu d'opérer avec le bouillon classique, on se sert d'un bouillon glycériné (4 pour 100), ou glycériné et glucosé (2 pour 100), lactosé (2 pour 100), mannité..., etc. De même, la gélose conseillée par M. Mazé pour la culture des bactéries des légumineuses se prépare en partant du bouillon de haricots sucré, dont nous avons indiqué le mode de fabrication, et en ajoutant 2 pour 100 de gélose.

6° **Sang gélosé.** — Il se prépare en puisant aseptiquement du sang dans la veine céphalique de l'homme, l'artère fémorale du chien, la carotide du lapin, etc., et en le mélangeant intimement, dans la proportion d'un tiers, à de la gélose (à 2 pour 100) encore liquide et maintenue à 40°. Par refroidissement, la gélose emprisonne le sang dans sa masse, sans lui faire subir de modifications appréciables. Les tubes de sang gélosé s'inclinent de la même façon que les tubes de gélose ordinaire.

7° **Gélose de Wertheim.** — Usitée pour la culture du gonocoque, elle se prépare, comme il a été dit plus haut, en ajoutant 1/3 de sérum (ou de liquide d'ascite) à de la gélose à 2 pour 100.

8° **Gélose de Pfeiffer.** — Employée pour la culture du bacille du même nom. S'obtient en coulant dans une boîte de Pétri de la gélose qu'on laisse refroidir. On prélève aseptiquement un peu de sang d'homme, de pigeon ou de cheval. On en laisse tomber quelques gouttes à la surface de la gélose et on les étale, de façon que la couche soit aussi régulière que possible. Les ensemencements se font ensuite par stries. Inutile de dire qu'au lieu de gélose en plaques on peut se servir de gélose en tubes. Cette méthode, consistant à recouvrir la gélose, peut s'appliquer aussi à la préparation de la gélose-sérum ; elle est plus expédi-

tive et donne d'aussi bons résultats. Elle nécessite très peu de liquide et convient surtout au cas où l'on veut se servir de sérum humain (Morax). Il est bon d'incliner les tubes pendant 24 heures, pour que le milieu soit bien imprégné de la sérosité ajoutée.

Il nous suffira de mentionner la gélose à l'hémoglobine de Huber, et la gélose au jaune d'œuf de Nastiukoff, obtenue en gélosant à 1,5 pour 100 le milieu dont nous avons déjà donné la formule.

C. Gelées de lichen.

Des milieux à base de gélose, nous pouvons rapprocher les gelées de lichen préparées par M. Miquel pour l'étude des microbes thermophiles. On fait digérer, pendant plusieurs heures, à 100°, 300 à 400 grammes de lichen Carragahen dans 10 litres d'eau. Passer au tamis. Faire bouillir à nouveau. Passer à l'étamine. Evaporer au bain-marie. Verser en couche mince dans des cuvettes de porcelaine, puis détacher la gelée et la sécher à 40° sur un filet à mailles serrées. En ajoutant 1 pour 100 de cette gelée desséchée à un milieu nutritif liquide, on le rend apte à résister à 50° sans qu'il perde sa consistance. La limpidité des gelées de lichen n'est jamais absolue. Elles conservent toujours une opalescence supérieure à celle de la gélose.

D. Milieux à base de gomme adragante.

Les milieux à base de gomme adragante sont plus louches encore que les milieux à base de lichen, mais ils présentent comme ceux-ci la propriété de se gonfler facilement sous l'influence des liquides. On commence par laver soigneusement la gomme adragante

à l'eau froide, puis on l'imbibe de 5 à 6 fois son poids d'eau. On laisse en présence à la température ambiante pendant 12 ou 24 heures. Le magma qui résulte de cette macération est additionné de 4 fois son volume de bouillon. On fait bouillir pendant quelques minutes ; on filtre à travers un linge fin ; on répartit en tubes et on stérilise.

E. Procédés destinés à mettre en évidence l'acidification des milieux solides précédents.

De même que le lait et le bouillon sucré, la gélatine et la gélose *sucrées* seront avantageusement additionnées de teinture bleue de tournesol. Celle-ci virera au rouge sous l'influence de la fermentation des sucres et pourra ainsi fournir une précieuse indication diagnostique.

M. Beyerinck conseille, pour mettre en évidence la production d'acide due à la fermentation, d'ajouter du carbonate de chaux finement pulvérisé aux milieux solides sucrés. L'acide formé diffuse hors des colonies microbiennes et solubilise les régions voisines, que l'on voit s'éclaircir de proche en proche, le reste du milieu conservant l'aspect laiteux que lui a donné l'addition de la craie divisée.

II. *Milieux solides proprement dits.*

1. **Pommes de terre.** — La pomme de terre rend en technique bactériologique de grands services. Beaucoup d'espèces bactériennes poussent à sa surface ; certaines d'entre elles (le b. de la morve, le b. typhique, par exemple) s'y développent de façon tout à fait caractéristique. La pomme de terre convient également bien pour la culture des bactéries chromogènes qui y donnent de fort belles couleurs. Toute

fois, un grand inconvénient de ce milieu nutritif tient à la différence de composition chimique qui existe entre les diverses races de pommes de terre, à la différence d'acidité en particulier. Les microbes (non chromogènes) se développent sur pommes de terre tantôt sous forme d'un enduit très léger, visible seulement sous une certaine incidence, tantôt sous forme d'un dépôt crémeux, blanchâtre, jaunâtre ou légèrement rosé, plus ou moins épais, parfois sous forme d'une véritable membrane plissée (sèche ou grasse).

Certains microbes (le b. de la morve par exemple) sécrètent évidemment un enzyme voisin de la tyrosinase, car ils noircissent la pomme de terre. D'autres, en liquéfiant l'amidon, arrivent à la creuser; d'autres enfin y donnent des gaz. La matière amylacée peut être transformée en amidon soluble, puis en dextrine, en maltose, en glucose et enfin en acides fixes et volatils. Ces modifications sont liées à la sécrétion d'amylase, de dextrinase, de maltase, etc., la part des organismes ensemencés.

Le meilleur procédé, pour l'utilisation de la pomme de terre, est celui qui a été indiqué par M. Roux. On découpe des fragments demi-cylindriques avec l'emporte-pièce de Quevrat, on les lave à l'eau, puis on les sèche entre deux feuilles de papier filtre. On les introduit ensuite dans des tubes de Roux, qu'on bouche avec de l'ouate. L'orifice des tubes a été soigneusement essuyé au préalable; sinon, il reste de l'amidon qui, après cuisson, fait adhérer le coton au verre. On chauffe une demi-heure entre 115° et 120°. Il est préférable de ne pas atteindre cette dernière température, car à 120° la pomme de terre court risque de brunir et de devenir friable. On sort de l'autoclave et on laisse refroidir, en inclinant le tube de façon que la face plane des fragments regarde en bas. La face courbe a été auparavant détachée de la

paroi du tube par un coup sec donné sur celui-ci. Ces précautions ont pour but d'empêcher la pomme de terre de se tasser et de se creuser. Après 12 à 14 heures, on redresse les tubes et on les capuchonne.

En l'absence d'emporte-pièce, on découpera des fragments parallélipipédiques dans les pommes de terre lavées et pelées avec un couteau à lame d'argent. Il est indiqué d'éviter les lames d'acier qui noircissent le parenchyme et même de toucher le moins possible les pommes de terre avec les doigts.

Un autre procédé consiste, les pommes de terre étant lavées, brossées et pelées, à couper, perpendiculairement au grand axe, des tranches d'un centimètre d'épaisseur. Séchées au papier filtre, ces tranches sont mises dans des boîtes de Petri, qu'on entoure de papier et que l'on stérilise entre 115° et 120° pendant 20 minutes. Les boîtes de Petri pourront être remplacées avec avantage par des cristallisoirs hermétiquement fermés à l'aide de couvercles à rainure, partant plus difficiles à infecter.

Tantôt la pomme de terre est employée à l'état naturel ; tantôt on fait tremper les fragments dans du bouillon simple ou glycériné dont on remplit, avant la stérilisation, la partie du tube de Roux située au-dessous de l'étranglement. On sait que le bacille de Koch pousse fort bien sur la pomme de terre ainsi glycérinée. Certains auteurs ont recommandé de neutraliser l'acidité des pommes de terre, en immergeant pendant quelque temps les fragments dans une solution alcaline faible. La purée de pommes de terre est parfois usitée, elle aussi ; elle peut être répartie en boîtes de Petri ou en fioles d'Erlenmeyer. On lui incorpore volontiers diverses substances.

2. **Gelée d'amidon.** — Délayer 10 grammes d'amidon dans 10 centimètres cubes d'eau ; ajouter, en agitant constamment, 150 centimètres cubes d'eau ou

d'un milieu liquide bouillant. On additionne ou non de carbonate de chaux, on répartit dans des matras coniques ou dans des boîtes de Petri et on stérilise. La formule suivante a été conseillée par Soyka :

Farine de riz.	10 grammes.
Lait.	15 cent. cubes.
Bouillon.	5 —

3. **Autres milieux solides.** — Il nous suffira de citer un certain nombre de milieux solides moins souvent employés : les tranches d'artichaut, appliquées par M. Roger au diagnostic différentiel du b. coli et du b. d'Eberth ; la pâte de pain et le pain azyme, employés tous deux pour la culture du b. prodigiosus et l'étude des moisissures ; les tranches de carottes et de betteraves (culture de l'oïdium albicans) ; les œufs cuits (*ubi supra*) ; la viande hachée (vibrion septique) ; les tranches et les bouillies des différents viscères ; etc.

CHAPITRE VI

MILIEUX A BASE DE SÉRUM

Les milieux à base de sérum ont une importance très grande en technique bactériologique. Tantôt liquides, tantôt solides, ils ne rentrent pas nettement dans la classification que nous avons donnée des milieux nutritifs. Pour ces deux raisons, nous croyons devoir leur consacrer un chapitre spécial. Nous indiquerons d'abord la façon de recueillir le sérum purement chez les grands animaux, chez les petits animaux et chez l'homme. Comme ces procédés ne sont pas toujours applicables, nous verrons ensuite la manière de récolter à l'abattoir un sérum qui contient forcément des germes et a besoin d'être stérilisé. Nous étudierons enfin cette stérilisation elle-même, puis la coagulation (ou gélatinisation) et nous dirons un mot pour terminer des usages du sérum en bactériologie.

1° *Manière de recueillir le sérum purement chez les grands animaux.*

1° La technique suivante a été donnée par MM. Nocard et Roux. Elle est d'un emploi très facile chez le cheval et chez le bœuf. Aux laboratoires de bactériologie, des instituts vaccinogènes sont parfois annexés. Les génisses saignées à l'aide de ce procédé peuvent, sans le moindre inconvénient, fournir une quantité notable de sérum.

Dans un flacon de deux litres environ, et à large goulot, on fait pénétrer jusqu'au fond l'une des branches d'un tube de verre coudé à angle droit. L'autre branche se continue avec un tube de caoutchouc, dont l'extrémité porte un ajutage susceptible de s'adapter à la douille d'un trocart de Nocard (fig. 67). La branche intérieure du tube sera elle-même un peu coudée, pour se terminer sur les bords du flacon (et non sur la face inférieure); la branche extérieure présentera un étranglement susceptible d'être facilement fermé à la lampe, mais pas trop fragile cependant. Le flacon, contenant un peu d'eau, est obturé à l'aide d'un tampon d'ouate; on enveloppe de papier l'extrêmité libre

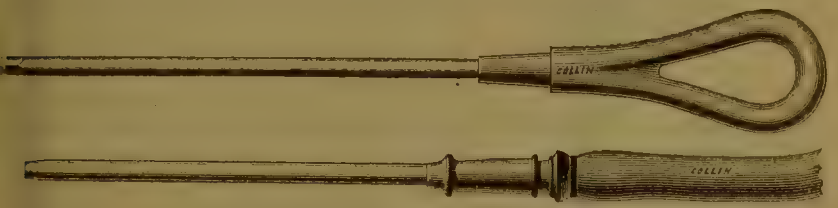


Fig. 67. — Trocart de Nocard.

du caoutchouc et on porte l'appareil à l'autoclave. Le trocart, enveloppé de papier lui aussi, sera stérilisé de son côté. La gouttière jugulaire de l'animal est rasée, puis désinfectée avec le plus grand soin. L'excès de sublimé ayant été chassé à l'eau stérilisée (ou mieux à l'alcool puis à l'éther), les quatre derniers doigts d'un aide compriment la veine jugulaire à sa partie inférieure, de façon à la faire saillir. Au niveau de la saillie, on incise au bistouri la peau, très épaisse, on plonge le trocart en plein vaisseau, on enlève l'aiguille et on adapte l'ajutage à la douille. Le sang coule dans le flacon, sans mousser, grâce à la disposition coudée du tube intérieur. La saignée terminée, on cesse de comprimer la veine; on enlève le trocart; on ferme le tube de verre au niveau

de sa partie étranglée et on laisse le sang se coaguler dans l'appareil. Il est très facile ensuite, à l'aide d'un ballon-pipette Chamberland par exemple, de prélever le sérum aseptiquement.

2° La méthode suivante, un peu moins sûre peut-être, permet de remplir successivement plusieurs flacons. C'est un sérieux avantage, qui en fait le procédé courant pour la récolte des sérums thérapeutiques. Comme tous les sérums sont plus ou moins bactéricides, on comprend qu'il n'y ait pas besoin ici de précautions aussi strictes que lorsqu'on manipule des liquides facilement altérables. Plusieurs flacons à large ouverture, tels que ceux que représente notre figure 68, sont fermés à l'aide de doubles de papier tendus sur leur orifice supérieur. On prépare, d'un autre côté, un tube de verre dont une extrémité est taillée en bec de flûte, tandis que la seconde se trouve, par l'intermédiaire d'un long tube de caoutchouc, reliée à l'ajutage d'un trocart. Les flacons, surmontés de cornets de papier, le trocart et le système précédent, également entourés de papier, sont stérilisés à l'autoclave. Lorsqu'on désire pratiquer une saignée, on introduit le trocart dans la veine (comme plus haut). Le tube de caoutchouc a été comprimé à l'aide d'une pince, de façon à éviter l'écoulement prématuré du sang. On enfonce le tube de verre à travers le papier qui ferme le flacon ; on cesse de comprimer le caoutchouc et on laisse couler le sang le long de la paroi du vase. Lorsque la quantité prélevée est suffisante, on pince à



Fig. 68. — Bocal pour recueillir le sang.

nouveau le caoutchouc, on enlève le tube et on coiffe le flacon de son cornet de papier. Si on désire obtenir une plus grande quantité de sang, on flambe le tube de verre, on l'enfonce à travers le papier d'un second flacon, on enlève à nouveau la pince de caoutchouc et on recommence l'opération. Finalement, le trocart est enlevé de la veine et les flacons sont portés dans un endroit frais. Lorsque le sang s'est coagulé, le sérum est aspiré, à l'aide d'un ballon-pipette ou d'une pissette, à travers le papier qui obture les flacons (on cautérise ce papier, avec une tige de fer rougie, au point où doit pénétrer l'effilure). Si les endroits frais conviennent pour la récolte du sérum, il faut par contre éviter les endroits trop froids. On peut considérer 15° à 18° comme représentant une température excellente. Une cave à température assez constante serait donc parfaite ; on absorbera l'humidité atmosphérique au moyen de chaux placée à terre dans des boîtes.

L'appareil Latapie, pour la récolte du sang chez les grands animaux, sera décrit dans le paragraphe suivant.

3° *Manière de recueillir le sérum purement chez les petits animaux.*

1° On pourrait à la rigueur prélever du sang dans la carotide d'un lapin ou d'un cobaye à l'aide d'un dispositif inspiré des précédents. Mais il vaut mieux se servir (comme l'a indiquée M. Latapie) d'un tube de verre de volume approprié, étranglé en son milieu et terminé à son extrémité supérieure par une effilure un peu longue, assez grosse, dirigée à 45° et contenant une bourre de ouate — et à son extrémité inférieure par une effilure courte, très aiguë et dirigée à angle droit. Le tube est stérilisé au four. La région carotidienne a été rasée, désinfectée et l'artère découverte.

Une ligature est posée sur le vaisseau, dont les dimensions augmentent immédiatement; si on ne veut pas sacrifier l'animal, on pose au-dessous une ligature d'attente. On coupe l'extrémité de l'effilure inférieure et on introduit celle-ci dans l'artère, à la manière d'une aiguille de seringue, la pointe dirigée vers le cœur. Le sang monte bientôt et remplit plus ou moins le tube. On retire l'effilure (c'est à ce moment qu'on serrera la ligature d'attente, si l'on n'a pris que peu de sang); on la ferme à la lampe et on laisse reposer le tube verticalement. Lorsque la coagulation s'est produite, on ferme à son tour la grosse effilure au-dessous de la bourre d'ouate et on renverse le tube. Le sérum s'écoule dans la partie inférieure, tandis que le caillot ne peut franchir l'étranglement. Celui-ci est sectionné à l'aide d'un trait au couteau à verre et d'une tige rougie au feu. Il est très facile alors de puiser le sérum aseptiquement.

Nous devons mentionner ici le tour de main suivant, dû à M. Marchoux, et destiné à retenir le caillot, qui s'égouttera d'autant mieux. Il consiste à hérisser de saillies la face interne de la partie du tube où doit se faire la récolte du sang. Il suffit pour cela de ramollir successivement au chalumeau plusieurs points du tube et d'y enfoncer brusquement une pointe métallique.

Au lieu de s'adresser à la carotide, on peut prélever le sang dans la fémorale ; on préfère presque toujours cependant la carotide, en raison de la plus grande facilité des manipulations.

2° M. Latapie, a perfectionné récemment l'appareil précédent. Nous décrirons les deux modèles qu'il préconise et qui sont destinés, l'un aux petits animaux, l'autre aux grands. Le premier (fig. 69) est constitué par un tube-trocart, ouvert à une extrémité

et terminé à l'autre par une effilure coudée, très aiguë et fermée à la lampe ; et par un réservoir-pipette, d'un diamètre un peu supérieur à celui du trocart. C'est un tube de verre, étranglé légèrement en son milieu, ouvert à sa partie supérieure, fermé par le bas et portant, à ce niveau, une longue effilure, coudée deux fois, qui sert à la distribution du sérum. Un peu au-dessous de l'étranglement, une tubulure bouchée avec de l'ouate permet l'accès de l'air dans l'appareil. Le tube-trocart est engagé, pour sa plus grande partie, dans le réservoir-pipette ; une bague de caoutchouc les rend solidaires. A l'intérieur de l'appareil, se trouve un tube de verre percé de trous

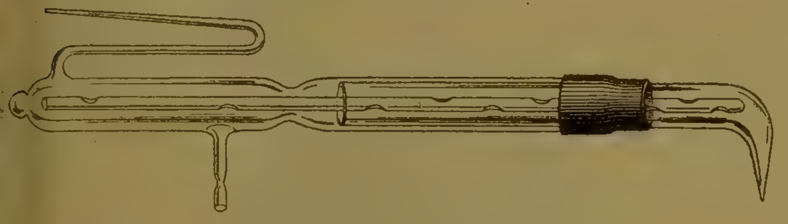


Fig. 69. — Appareil Latapie (petit modèle).

autour duquel viendra se rétracter le caillot. L'appareil est stérilisé à l'autoclave. On casse et on flambe l'effilure du tube-trocart ; on enfonce la pointe dans l'artère carotide (ou fémorale) dénudée. Le sang monte doucement ; on arrête la saignée avant que le tube ne soit complètement rempli ; on ferme l'effilure à la lampe, en aspirant légèrement pour empêcher le sang de couler pendant la fermeture. On laisse ensuite reposer l'appareil, le tube-trocart en bas. Le caillot se forme autour de la tige centrale et s'y rétracte. Dès que la coagulation est terminée, il n'y a qu'à retourner l'appareil ; le sérum tombe dans le réservoir-pipette. Pour le recueillir, il suffit de briser, après l'avoir flambée, la pointe de l'effilure bicoudée et de distribuer, suivant les procédés ordinaires. On

obtient ainsi, dans des conditions d'asepsie parfaites, une quantité maxima de sérum (80 pour 100 environ de la masse totale de sang).

L'appareil destiné à recueillir le sérum chez les grands animaux (fig. 70) est basé sur le même principe que le précédent ; il n'en diffère que par sa forme et par une plus grande complication. Il offre cet inconvénient que les tubes de verre se brisent facilement dans l'autoclave. Assez difficile à manier, il ne présente pas — si l'on en excepte le rendement plus considérable en sérum — de sérieux avantages sur les dispositifs très simples et très pratiques décrits au paragraphe précédent.

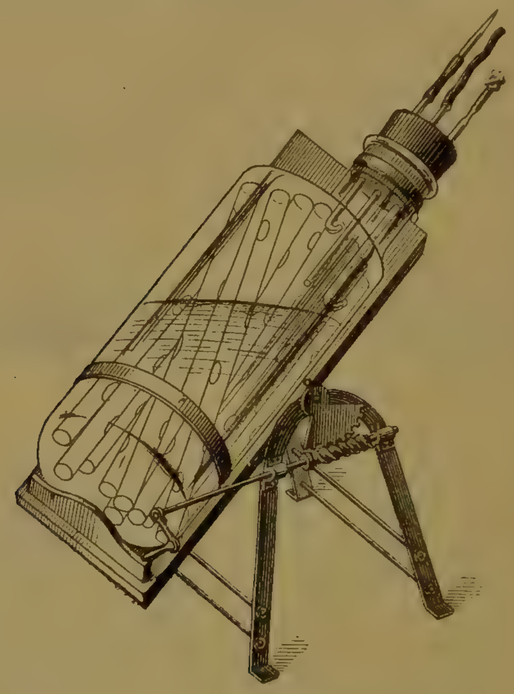


Fig. 70. — Appareil Latapie (grand modèle).

La quantité de sang qu'on peut prélever à un ani-

mal sans compromettre son existence est fixée par les auteurs au 1/5 environ de la masse totale. L'opération peut être répétée un certain nombre de fois, à des intervalles convenables, particulièrement chez les animaux de forte taille. Chez les animaux de petite taille, qu'on peut sacrifier sans inconvénient, le meilleur moyen de recueillir le sang sera souvent de le puiser directement à l'aide d'une pipette stérile dans l'oreillette ou le ventricule cautérisés au fer rouge.

3° *Manière de recueillir purement chez l'homme le sérum et les sérosités.*

1° Dans certains cas, où l'on n'a besoin que d'une petite quantité de sang, on peut l'aspirer dans une veine du pli du coude. La région est aseptisée avec le plus grand soin. Une ligature est posée à la partie moyenne du bras ; on prie le sujet de serrer dans sa main un objet arrondi, absolument comme pour la saignée. Les veines du pli du coude font saillie ; on enfonce dans l'une d'elles l'aiguille d'une seringue stérilisée à l'autoclave et on aspire. Le sang est immédiatement refoulé dans un tube stérile où le sérum se détache du caillot.

2° Si l'on a besoin de grandes quantités de sérisité, il est préférable de recourir aux épanchements pleurétiques ou ascitiques. Pour s'assurer que ceux-ci ne contiennent pas de germes *in vivo*, on fera une ponction exploratrice à l'aide d'une seringue stérilisée et on ensemencera (en bouillon ou à la surface de la gélose) un peu du liquide obtenu. Si les milieux demeurent stériles, la sérosité peut être utilisée ; elle peut l'être à la rigueur dans le cas contraire, à condition de filtrer le liquide. La présence du bacille de Koch, non décelable à l'aide des

ensemencements précédents, est pratiquement sans inconvénients. Pour prélever la sérosité en masse, on stérilise à l'autoclave à 120° un ou plusieurs flacons de l'appareil Potain bouchés à l'ouate. On stérilise d'autre part un système comprenant le bouchon de cet appareil, dont un des robinets est relié par un long caoutchouc à l'aiguille-trocart et dont l'autre est réuni par un caoutchouc plus court à un tube de verre contenant un tampon d'ouate. Ce tampon servira à filtrer l'air lors des manipulations. La paroi thoracique ou abdominale est aseptisée avec grand soin. Le bouchon d'ouate est remplacé par le bouchon de caoutchouc, le vide fait et l'aiguille introduite dans la cavité séreuse, au travers d'une petite escarre produite au thermocautère (cette dernière précaution n'est pas indispensable). Le robinet étant ouvert, le liquide s'écoule dans la flacon. Lorsque celui-ci est aux trois quarts plein, il est facile, le robinet de communication avec la cavité étant fermé, de faire rentrer l'air, d'enlever le bouchon de caoutchouc, de retirer le flacon rempli, de le boucher avec un tampon d'ouate stérilisé et d'adapter un nouveau flacon stérilisé, au bouchon de caoutchouc préalablement flambé. La sérosité peut être finalement aspirée dans des ballons-pipettes Chamberland et répartie dans des ballons ou des tubes à essai, qui sont éprouvés par un séjour à l'étuve. Comme ce procédé comporte quelques risques, il vaut mieux distribuer de suite le liquide.

L'épanchement ascitique se prête particulièrement bien à la récolte d'une grande quantité de sérosité. Aussi lui donne-t-on la préférence. On simplifie alors la technique, vu l'abondance du liquide et la possibilité d'employer un fort trocart qui facilite son écoulement. Les appareils usités sont alors ceux que nous avons décrits à propos du prélèvement du sang chez les grands animaux. Inutile d'insister. Il est

facile de recueillir 10 litres et plus de sérosité, ce qui permet de faire une ample provision d'un liquide comparable à lui-même.

3° On peut prélever, au moment de l'accouchement, le sang du placenta. Voici comment procède M. Bumm. Dès que le cordon a été sectionné entre deux ligatures, on lave au sublimé puis à l'eau stérilisée son extrémité placentaire (le placenta est naturellement laissé dans l'utérus) et on dispose sous cette extrémité l'orifice d'un flacon stérile. On sectionne, avec des ciseaux stériles : le sang s'écoule. On peut en obtenir de 100 à 150 centimètres cubes. Le flacon, rebouché, est mis dans un endroit frais, où le sérum ne tarde pas à se détacher du caillot. Nous pensons qu'il y aurait avantage à ne pas laver le cordon au sublimé; l'eau stérilisée suffirait simplement.

4° Nous ne signalerons que pour mémoire les procédés qui consistent à obtenir du sérum à l'aide d'une saignée ou de ventouses scarifiées. Quelles que soient les précautions prises, le sang recueilli de cette façon est impur, et il importe de filtrer ou de stériliser le sérum par la méthode de Tyndall.

4° *Manière de recueillir le sèrum du bœuf à l'abattoir.*

La récolte aseptique du sérum est de beaucoup le meilleur procédé. Si l'on se trouve dans l'impossibilité d'y recourir, on recueillera à l'abattoir chez le bœuf le sang qui s'écoule des vaisseaux du cou au moment de la mort de l'animal. L'opération doit être effectuée de la façon suivante, afin de parer le plus possible à la souillure du liquide. Des boîtes de Koch (fig. 67),

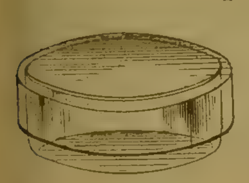


Fig. 71. — Boîte de Koch.

entourées de papier, sont stérilisées au four Pasteur une demi-heure à 180°, ou à l'autoclave un quart d'heure à 115°. On sait que chacune de ces boîtes, constituée par deux cristallisoirs emboîtés, offre une capacité d'environ deux litres. Lorsque le sang sort des vaisseaux, on laisse s'écouler les premiers jets, toujours fortement souillés. Les suivants sont recueillis dans les boîtes. On remplit celles-ci à moitié ou aux deux tiers et on les transporte avec précaution dans un endroit frais où on les incline fortement. Après quelques heures, on peut les incliner en sens inverse et inciser la surface du caillot, peu profondément, mais assez cependant pour faciliter l'écoulement du sérum. La séparation de celui-ci sera également facilitée par le dépôt, dans la boîte, de baguettes ou de plaques de verre, stérilisées en même temps qu'elle. Au bout de 24 ou 48 heures, le sérum est bien collecté ; on l'aspire (après 24 heures l'été, 24 ou 48 l'hiver) à l'aide de ballons-pipettes ou de pissettes. Si on doit le stériliser par la méthode de Tyndall, on le refoule dans des ballons à long col qui sont ensuite fermés à la lampe.

Il nous suffira de mentionner en terminant que si on dispose d'un centrifugeur, un procédé très rapide pour obtenir du sérum consiste à défibriner le sang et à l'essorer. Cette méthode, surtout pratique lorsqu'on n'a besoin que d'une petite quantité de sérum (pour le séro-diagnostic par exemple), pourrait être appliquée en grand (même dans la préparation des sérums thérapeutiques, comme l'ont indiqué MM. Kolle et Turner), à la condition de posséder un moteur puissant et des appareils volumineux.

5° *Stérilisation du sérum.*

La stérilisation du sérum peut être obtenue par

filtration. Pour que le sérum filtre bien, il est nécessaire qu'il ne renferme ni trop d'hématies, ni trop de leucocytes. On est averti, par la coloration rouge de certains liquides, que leur filtration ne s'opérera que moyennant de grandes difficultés. Les sérums visqueux filtrent également fort mal. On choisira une bougie Chamberland à pâte tendre (bougie F), et l'on portera le sérum à 40°-45° dans un bain-marie, en ayant soin de refroidir le vase où il doit se rendre au sortir de l'appareil, car, à pression très réduite, le sérum bout dans la bougie et mousse beaucoup à la sortie (Miquel). Avec la bougie Berkefeld, la filtration du sérum n'offre guère de difficultés et celle des sérosités se réalise fort simplement. Lorsqu'on ne veut pas recourir à la filtration, il faut employer la stérilisation discontinue. Le principal inconvénient de la méthode de Tyndall est sa grande lenteur. Le sérum, renfermé dans des ballons scellés à la lampe, est chauffé tous les jours pendant une heure à 58° dans un bain-marie pourvu d'un régulateur de Roux ; 6 à 7 chauffages sont nécessaires. Il faut prendre garde que la température du bain ne s'élève au-dessus de 58°, ce qui exposerait à la coagulation du liquide.

6° *Coagulation du sérum.*

Lorsque le sérum a été recueilli purement ou filtré, on le répartit en tubes d'emblée ou bien l'on prélève au moment du besoin la quantité nécessaire dans les vases qui le contiennent. Lorsqu'il a été stérilisé par la chaleur, les ballons scellés à la lampe sont ouverts en faisant un trait au couteau à verre et en appuyant sur ce trait l'extrémité d'une tige rougie au feu. Le sérum est aspiré au ballon-pipette et réparti dans des tubes à essai, remplis à raison de 3 travers de doigt. La coagulation du sérum peut

se faire avantageusement dans l'appareil de Koch (fig. 72). C'est une caisse métallique rectangulaire à double paroi et à couvercle de verre mobile. Elle est montée sur 3 pieds ; le pied antérieur se raccourcit à volonté, de façon à produire telle inclinaison que l'on désire. La double paroi est remplie d'eau. On chauffe l'ensemble à l'aide d'une rampe de gaz, commandée par un régulateur de Roux. Pour se servir

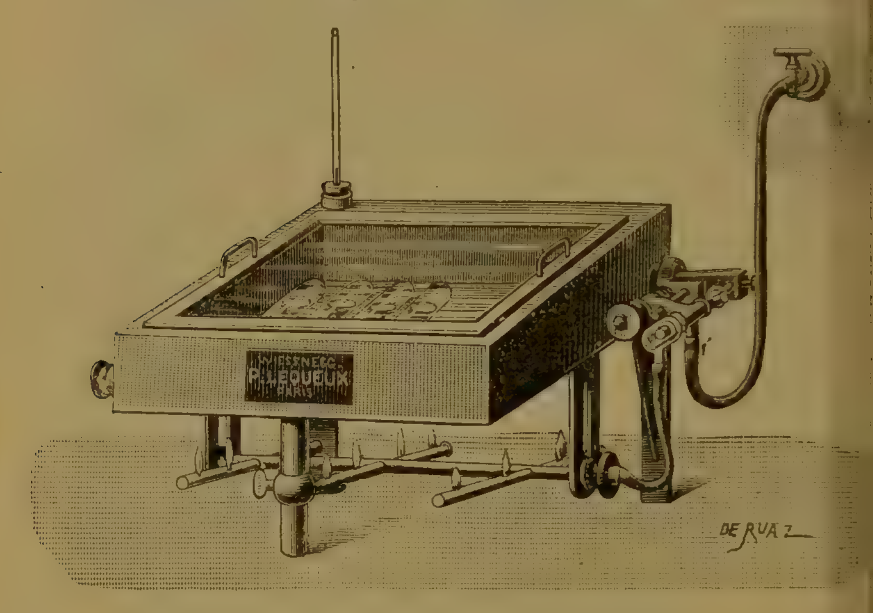


Fig. 72. — Coagulateur de Koch.

de l'appareil, on allume le gaz et on règle à 68°. Lorsqu'on s'est assuré que la température se maintient bien à ce niveau, on soulève le couvercle et on dispose les tubes de sérum, en ayant soin que le liquide ne vienne pas toucher le bouchon de coton. Un thermomètre, placé à côté des tubes, permet à tout instant de contrôler la température. Au bout d'une à deux heures, le sérum commence à faire prise. De temps en temps, on prend à la main un

tube (toujours le même); on le redresse et on regarde si la gélatinisation est complète ou non. On retire les tubes dès que le milieu ne s'effondre plus par redressement. Il faut éviter de dépasser ce moment, sous peine de voir se dessécher la mince couche de sérum qui se trouve à l'extrémité supérieure du tube. Le sérum coagulé doit être demi-transparent et présenter une légère coloration ambrée. Pour obtenir un milieu parfaitement clair, M. Vagedes conseille de le coaguler dans une atmosphère de vapeur d'eau. Pour cela, il place dans l'appareil de Koch plusieurs boîtes de Petri remplies d'eau. Nous recommandons ce procédé, qui nous a très bien réussi.

Lorsqu'on ne dispose pas d'un coagulateur de

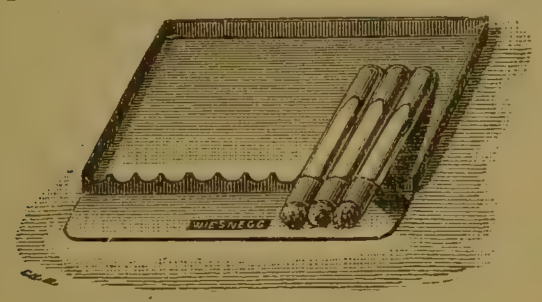


Fig. 73. — Support incliné.

Koch, on peut faire usage d'une étuve de Roux ou de d'Arsonval réglée à 68°. L'inclinaison voulue est donnée aux tubes à l'aide d'un artifice quelconque. Un moyen encore plus simple consiste à se servir d'une caisse en métal rectangulaire, aplatie et sans couvercle, dont un des bords porte des encoches destinées à recevoir l'extrémité supérieure des tubes (fig. 73). Ceux-ci reposent par leur fond sur la paroi inférieure de la boîte et sont ainsi maintenus en position inclinée. Après avoir mis un peu d'eau dans la caisse et l'avoir recouverte d'une lame de

verre, on la dispose sur une casserole pleine d'eau, qu'on porte à l'ébullition. C'est ainsi que l'on coagule également d'habitude les tubes d'albumine.

7° *Usages du sérum.*

En technique bactériologique, il n'est généralement pas indifférent de recourir au sérum de telle ou telle espèce animale. Par exemple, c'est dans le sérum liquide de lapin jeune que le pneumocoque pousse le plus abondamment et avec les capsules les plus caractéristiques (Bezançon et Griffon). Le gonocoque préfère les milieux au sérum humain (Bumm) ou au liquide d'ascite (Morax).

Les sérums s'emploient tantôt coagulés, tantôt liquides. Dans les deux cas, on les mélange souvent à d'autres substances. Nous avons déjà mentionné le bouillon-sérum, préparé d'ordinaire avec deux parties de bouillon peptonisé et une partie de sérum liquide ou de sérosité d'ascite. Il nous reste à citer :

1° Le sérum glycériné (coagulé), applicable à la culture du bacille de la tuberculose. Pour le préparer, il suffit d'ajouter au sérum 4 pour 100 de son poids de glycérine stérilisée à l'autoclave (M. Vagedes préfère n'ajouter que 2,5 pour 100).

2° Le mélange à parties égales de sang défibriné de lapin et de sérosité d'ascite, ou encore le mélange (*ââ* également) de sang peptoné de chien et de liquide d'ascite, excellents pour la conservation du pneumocoque (Besançon et Griffon) ; on les emploie sous forme liquide.

3° Le sérum préconisé par M. Löffler pour le diagnostic rapide de la diphtérie. Il se prépare en ajoutant, à 3 parties de sérum liquide, une partie de bouillon peptonisé à 1 pour 100, salé à 0,5 pour 100 et glucosé à 1 pour 100. On coule en boîtes de Petri et on

coagule. Il faut savoir que la coagulation de ce sérum, ainsi que celle du sérum glycériné, ne s'obtient qu'à une température supérieure à celle nécessaire pour coaguler le sérum ordinaire.

Dans le sérum liquide, les microbes poussent en général assez mal. Nous étudierons plus tard les propriétés bactéricides et agglutinantes de certains sérums normaux ou spécifiques.

A la surface du sérum coagulé, les colonies apparaissent ordinairement comme de petites saillies blanchâtres ou jaunâtres, qui augmentent peu à peu de volume ; elles peuvent rester isolées ou se réunir sous la forme d'un dépôt plus ou moins épais. Certains microbes, qui liquéfient la gélatine, liquéfient aussi le sérum. Nous citerons : le vibrion cholérique, le b. subtilis, la bactéridie charbonneuse, le b. prodigiosus, le b. pyocyanique, etc... Le bacille de Preisz-Nocard donne des cultures jaunes d'or sur le sérum de bœuf et blanches sur le sérum de cheval ; le bacille diphtérique (qui offre avec le microbe précédent un certain nombre de caractères communs) se comporte de même, bien que la coloration sur sérum de bœuf soit moins vive. Nouvelle preuve de la différence de propriétés qui distingue les sérums des divers animaux.

CHAPITRE VII

ENSEMENCEMENTS. — MISE EN CULTURE. — CONSERVATION DES SEMENCES. — RÉGLAGE DES ÉTUVES

I. *Ensemencements.*

Instruments nécessaires. — L'instrument le plus usité pour les ensemencements est le fil de platine monté. Il se fabrique extemporanément comme il suit. On ramollit une baguette de verre au chalumeau à l'une de ses extrémités, et au moment où le verre commence à entrer en fusion, on y enfonce l'extrémité d'un fil de platine porté au rouge blanc. Puis on continue à chauffer dans la flamme éclairante, pour re-



Fig. 74. — Porte fil.

froidir lentement le verre. Les fils ainsi fabriqués présentent cet inconvénient que, sous l'influence de chauffages répétés, le verre éclate parfois au niveau du point d'enchâssement. On peut y remédier en se servant de tiges de verre à extrémité émaillée ou mieux du porte-fil métallique que représente notre figure (fig. 74). Il possède cet avantage qu'un dispositif très simple permet de varier la longueur du fil suivant l'ensemencement qu'on doit pratiquer. Quel que soit le genre de monture adopté, il est bon d'a-

voir à sa disposition trois fils de platine (fig. 75), l'un droit, pour les ensemencements par piqûre, un second à bout recourbé en œilleton pour les cultures en milieu liquide — c'est ce fil qu'on nomme plus simplement anse de platine (öse des Allemands) — et un troisième, plus épais, aplati à son extrémité et destiné à écraser sur les milieux solides les produits un peu résistants (on peut employer dans le même but une petite saptule en nickel). Lorsqu'on veut se servir d'un fil de platine, on le chauffe au rouge dans toute son étendue et avant de prélever le produit à ensemencer, on attend un instant qu'il soit refroidi. L'ensemencement terminé, il faut avoir soin de porter à nouveau le fil au rouge, afin de détruire tous les germes déposés à sa surface.

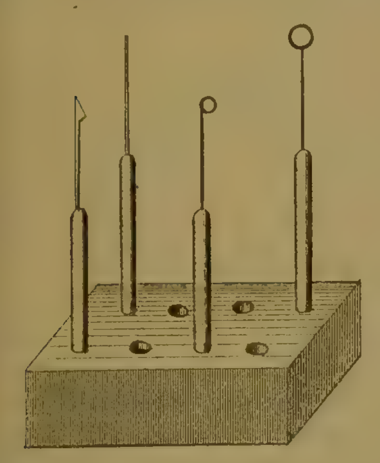


Fig. 75. — Fils de platine montés.

Très employées également sont les pipettes Pasteur dont nous avons indiqué la préparation. L'extrémité de la pipette est flambée, coupée au couteau à verre ou bien brisée à l'aide d'une pince ou des doigts, puis flambée à nouveau. Le produit à ensemencer est aspiré dans son intérieur dès qu'elle est refroidie ; il est ensuite transporté dans le milieu nutritif.

Les aiguilles de verre, dont on fait parfois usage, se fabriquent comme les pipettes, avec cette différence qu'on emploie du verre plein au lieu de verre creux.

Culture dans les milieux liquides. — Nous prendrons pour type de notre description la culture en tube à essai, de beaucoup la plus employée. Sup-

posons un « passage » de bouillon en bouillon. Le tube qui contient le produit à ensemencer est tenu entre le pouce et l'index de la main gauche. Son extrémité supérieure et le tampon de coton qui la surmonte ont été flambés à la flamme chauffante du bec de Bunsen. La main droite tient la baguette de verre qui supporte l'anse de platine (préférable ici au fil droit, qui enlèverait souvent trop peu de semence). Celle-ci est portée au rouge vif. Dès qu'elle est refroidie, la main droite, sans lâcher la baguette de verre, débouche le tube à essai que la main gauche a incliné vers elle de façon convenable. L'anse de platine est enfoncée rapidement dans la culture, puis retirée. Le tube qui contient la semence est rebouché à l'aide du tampon de coton. Ce tube peut alors être déposé. Sans perdre de temps, on saisit de la main gauche devenue libre le tube dans lequel on désire faire l'ensemencement et dont on a préalablement flambé la partie supérieure et le coton ; on retire ce dernier à l'aide des derniers doigts de la main droite et on introduit dans le bouillon neuf l'anse de platine chargée de semence. Le tube est rebouché immédiatement. L'anse est portée au rouge ; l'ensemencement est terminé. Il ne reste qu'à apposer sur le tube une étiquette donnant la nature et la date de l'ensemencement, puis à mettre à l'étuve.

Cette opération, extrêmement simple, est passible cependant de quelques remarques qui s'appliquent à tous les ensemencements. Elle doit être faite rapidement, de façon à diminuer les chances d'infection par les germes extérieurs. Les débutants feront bien, avant toute autre chose, de s'exercer à la répéter automatiquement. Les ensemencements difficiles seront pratiqués dans une pièce peu fréquentée. Il faut toujours éviter de passer les manches des vêtements au-dessus des tubes à essai débouchés. On doit de

même éviter avec le plus grand soin les mouvements brusques et étendus, susceptibles de mobiliser les germes de l'atmosphère. Dans aucune circonstance, l'« économie des mouvements » n'est plus de mise. Enfin, le tube à essai qui contient le produit à ensemencer, comme celui qui renferme le bouillon neuf, ne seront jamais dirigés verticalement, ce qui les exposerait à être contaminés par les microbes de l'air, mais, au contraire, le plus obliquement possible. Certains bactériologues, par précaution, tiennent les deux tubes à la fois dans la main gauche, pour réduire au minimum les chances de contamination.

Ce que nous venons de dire, de l'ensemencement en bouillon d'une culture également en bouillon, permettra de parer aux autres cas qui peuvent se présenter, sans qu'il soit nécessaire d'insister longuement. Les ensemencements en bouillon, d'une culture développée sur un milieu solide, se feront à l'aide du fil de platine droit ou étalé en spatule. Les ensemencements des humeurs ou pulpes d'organes recueillies aux autopsies se feront au moyen de la pipette Pasteur. Si l'ensemencement ne suit pas immédiatement le prélèvement, et que la pipette ait été par conséquent fermée, on la sectionnera au-dessous du coton et on en puisera le contenu avec une seconde pipette. Les grands ballons seront avantageusement ensemencés à la pipette; pour éviter les impuretés accidentelles, on glissera l'effilure entre le goulot et le coton, légèrement écarté. Le concours d'un aide pourra être nécessaire lorsque l'on a affaire à des ballons nombreux ou très volumineux.

Il faut avoir soin de proportionner toujours la quantité de semence au volume du liquide, car un ensemencement est un changement de milieu et un certain nombre de microbes meurent forcément

à cette occasion. En ensemençant avec une quantité de semence trop minime une grande quantité de milieu nutritif, on s'expose à un échec complet ou tout au moins à un retard dans le développement de la culture (il y a d'ailleurs à cet égard des différences notables entre les bactéries; l'usage les fera connaître). Il faut compter que, par litre de bouillon, 2 ou 3 centimètres cubes de semence sont généralement nécessaires.

Il est indiqué dans certains cas (tuberculose, farcin du bœuf) d'ensemencer en voile à la surface du bouillon. On y arrive très facilement à l'aide d'une grosse anse de platine recourbée à angle droit sur sa tige. C'est dans ce cas surtout qu'il faut redoubler de précautions, car on est obligé de déboucher complètement le flacon qui contient la semence et celui dans lequel on la transporte. Nous recommandons de se mettre alors en bras de chemise et de relever les manches de celle-ci.

Lorsqu'on désire qu'un microbe très aérobie, mais non pas mobile, (le bacille de la peste, par exemple,) se développe aisément à la surface d'un liquide, on dépose sur ce liquide un peu d'huile ou de beurre stérilisés (Haffkine). Il faut, bien entendu, que le microbe ait par lui-même de la tendance à former un voile.

Culture sur les milieux solides. — Les milieux solides peuvent être ensemencés par strie ou par piqûre.

Qu'il soit pratiqué sur gélatine, gélose, sérum coagulé ou pomme de terre, l'ensemencement par strie s'opère de façon analogue. Il consiste à tracer avec l'extrémité du fil de platine et de bas en haut une traînée droite, médiane et régulière à la surface du milieu de culture, qu'on évitera d'entamer. Si cependant on désirait récolter une plus grande quantité de microbes, on barbouillerait pour ainsi dire

toute la surface du milieu avec un fil en anse ou une spatule. Nous rappelons, à ce propos, que les cultures massives sur milieux solides nécessitent l'emploi de la boîte de Berthier. Pour l'ensemencement sur pomme de terre, le fil-spatule ou la spatule sont presque indispensables, à cause de l'inégalité et de la résistance des surfaces. Notons encore que dans quelques rares circonstances (tuberculose humaine) il est indiqué de pénétrer légèrement avec la spatule dans le milieu employé. Lorsqu'on s'adresse à des tubes de gélose ou de sérum coagulé, il faut toujours éviter de faire couler l'eau de condensation sur les parties ensemencées.

L'ensemencement par piqûre, pratiqué le plus souvent dans la gélatine droite, demande, pour être réussi, quelques précautions. On peut tenir le tube horizontalement, mais il est préférable de le tenir verticalement, l'orifice regardant en bas. Le tampon de coton sera placé entre les deux derniers doigts de la main gauche et avec la main droite, absolument libre, on enfoncera le fil de platine au milieu du cylindre de gélatine, en laissant descendre en même temps celui-ci par son propre poids. La piqûre terminée, on laissera glisser à son tour le fil de platine qui ne devra laisser aucune trace de son passage, si l'ensemencement est bien fait. Inutile de dire que ce fil doit être parfaitement droit et enfoncé parallèlement à l'axe du tube. Nous rappellerons que les tubes qui renferment des milieux solides doivent toujours être coiffés d'un capuchon de caoutchouc. Il va de soi qu'on évitera de prendre les tubes de gélatine par le fond, ce qui les exposerait à se liquéfier.

II. *Mise en culture.*

Les ensemencements terminés, les tubes à essai, éti-

quetés, sont mis dans un cylindre en carton ou en fer-blanc, dans des vases de verre garnis de coton ou encore dans des supports en bois, et ils sont portés à l'étuve. La température à laquelle ils doivent être soumis varie suivant le milieu nutritif et l'espèce ensemencée. Pour la majorité des pathogènes, la température optima est celle du corps humain, soit 37°. On disposera donc d'une étuve réglée pour cette température. Une autre étuve, réglée à 22°, servira pour les saprophytes (les chromogènes en particulier) et pour les cultures en gélatine.

La température de 37° n'est pas suffisante pour le bacille de la tuberculose humaine qui exige une chaleur fixe de 38°,5. Elle est, par contre, trop élevée pour le bacille de la peste dont l'optimum thermique oscille autour de 30°, pour le bacille de la tuberculose zoogléique qui pousse bien mieux à 25-30° qu'au-dessus etc. . Les cultures mises à l'étuve seront surveillées attentivement. Le moment auquel les micro-organismes commencent à pousser varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Le bactérium du choléra des poules apparaît au bout de 2-3 heures, le bacille coli et le vibrion cholérique après 6 à 8 heures, la majorité des autres après 12 à 20 heures, certains après 48 (morve), etc... Par contre, les cultures du bacille de Koch et de certaines streptothricées ne deviennent guère visibles avant 3 à 4 semaines.

Nous avons déjà mentionné les caractères principaux des colonies sur les divers milieux. Nous n'y reviendrons pas.

III. *Conservation des semences.*

Les cultures microbiennes perdent leur virulence, puis leur vitalité, au bout d'un temps qui varie beau-

coup avec les diverses espèces, ainsi qu'avec les conditions ambiantes.

L'influence de l'espèce est capitale. Les organismes sporulés peuvent être conservés un an et plus. Parmi les types non sporulés, certains ne vivent ordinairement que quelques jours (bacille de Pfeiffer) ou que deux à trois semaines (bacille de la morve, bacille charbonneux asporogène) ; d'autres se conservent facilement plusieurs mois (bacille tuberculeux, streptothrix). On fera bien, en tout état de cause, de repiquer le plus souvent possible les cultures, alors même qu'on a affaire à des germes considérés comme peu fragiles (bacille typhique, colibacille, pneumobacille, etc.).

Parmi les conditions ambiantes, il faut citer tout d'abord la température. Le froid favorise la conservation des microbes ; aussi est-il indiqué de garder toujours les semences à la glacière, ou tout au moins dans l'endroit le plus froid du laboratoire. Cette règle souffre cependant quelques exceptions ; le gonocoque et le bacille de la conjonctivite chronique, susceptibles de vivre plusieurs semaines à 37°, meurent habituellement en 48 heures à la température de la chambre (Morax). L'aération constitue le plus souvent une cause puissante de destruction, d'où le précepte de renfermer les semences dans des ampoules. On étranglera une pipette Pasteur au-dessous du tampon de coton (fig. 76) et, après avoir aspiré la culture liquide (ou

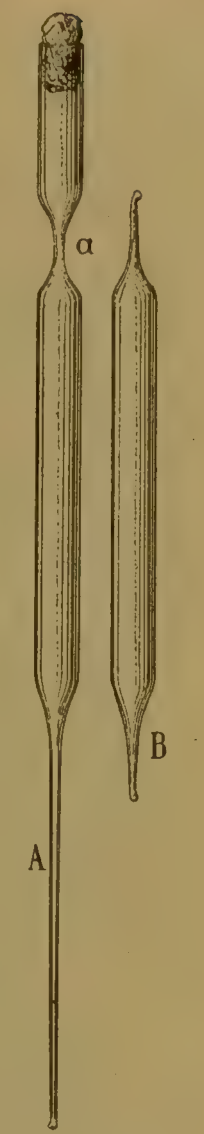


Fig. 76. — Transformation d'une pipette Pasteur en ampoule.

l'émulsion de culture solide), on fermera à la lampe. La consistance et la nature des milieux jouent aussi un grand rôle. Les cultures piquées dans la gélose droite, par exemple, se conservent mieux que les cultures en bouillon ; les cultures en milieux-sérum ou en milieux-sang mieux que les cultures en milieux ordinaires. Aussi voyons-nous M. Petruschky garder les semences du streptocoque dans la gélatine, et M. Marmorek dans le bouillon-sérum ; aussi MM. Bezançon et Griffon conseillent-ils, pour éviter la mort du pneumocoque à la température de l'étuve, l'ensemencement dans un mélange à parties égales de sang défibriné de lapin ou de chien et de liquide d'ascite (*ubi supra*). Les microbes qui modifient la réaction du milieu ne tardent pas à subir les conséquences de l'acidité ou de l'alcalinité produites ; on peut pallier le premier de ces inconvénients en additionnant ce milieu de carbonate de chaux, et le second en recourant au gypse (Brieger), mais il vaut mieux éviter tout changement de réaction un peu exagéré, surtout dans le sens de l'acidité. Pour combattre la production de cette dernière (toujours liée à la décomposition des hydrates de carbone) on se servira de milieux dépourvus de sucres fermentescibles ; on saura aussi que l'addition de sérum empêche la transformation de ceux-ci, lorsque leur taux n'est pas trop élevé.

Réglage des étuves.

Il résulte de ce qui a été dit plus haut qu'il est très important de maintenir les étuves à une température constante, préalablement déterminée. On y parvient au moyen de régulateurs spéciaux, dont les modèles sont très nombreux. Nous décrirons les trois types les plus usités, applicables seulement au chauffage par le gaz.

A. Régulateur de Chancel (à mercure).

La figure ci-jointe (fig. 77) permet de comprendre très facilement le fonctionnement de cet appareil.

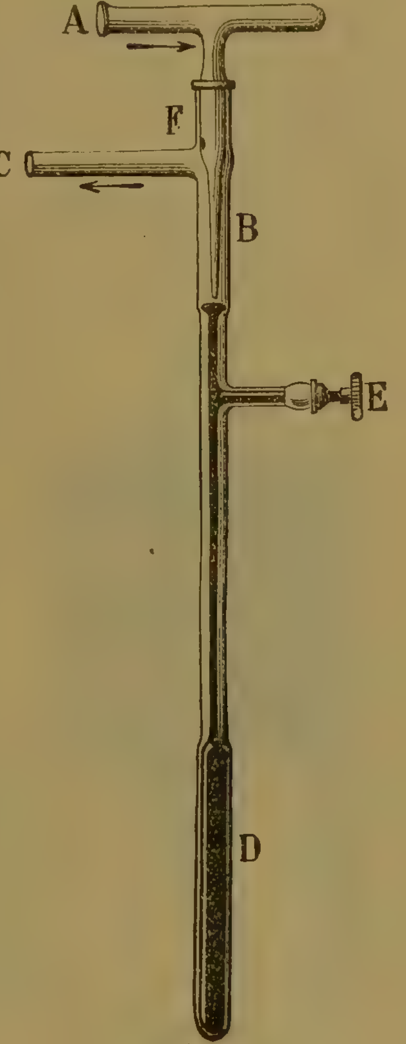


Fig. 77. — Régulateur Chancel.

Le gaz entre en A ; il passe par le bec de flûte B, avant de sortir en C pour se rendre aux brûleurs. Le bec de flûte B peut être obstrué plus ou moins complètement par le mercure placé dans la partie D de l'appareil, ce qui amène, dans le débit du gaz, les variations voulues. Supposons le régulateur en place, et l'étuve réglée (par le jeu de la vis E) ; si la température tend à s'élever au-dessus du degré voulu, le mercure se dilate et ferme plus ou moins complètement l'orifice oblique de B. D'où diminution dans la quantité de gaz qui se rend aux brûleurs. Si, au contraire, l'étuve se refroidit, le mercure baisse et la flamme s'élève parallèlement. La vis E permet d'aug-

menter ou de diminuer artificiellement la hauteur du mercure et un trou de sûreté F, placé sur le tube d'amenée, évite l'extinction du gaz en cas d'obstruction complète du bec de flûte.

B. Régulateur de d'Arsonval.

La couche d'eau interposée entre les deux parois de l'étuve presse sur une membrane élastique qui constitue le plafond d'une petite chambre destinée à contenir le gaz (fig. 78). Cette chambre reçoit en son centre le tube d'arrivée, qui peut être approché plus ou moins de la membrane, à l'aide d'une virole. Latéralement, se trouvent les tubes de départ, en relation avec les brûleurs. Lorsqu'on veut régler l'étuve, on éloigne le tube d'arrivée de la lame élastique, de telle façon que, le gaz arrivant à plein courant, les brûleurs donnent le maximum de flamme. Quand le thermomètre indique une température légèrement inférieure à celle qu'on désire obtenir, on rapproche

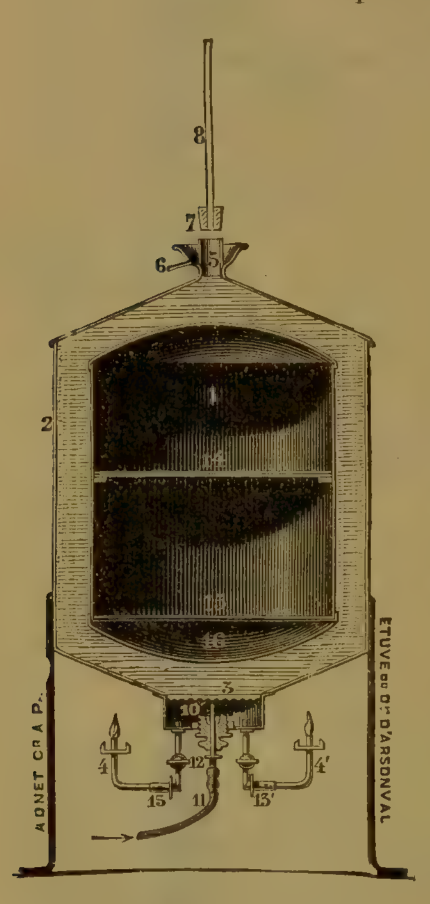


Fig. 78. — Étuve de d'Arsonval.

de la lame l'extrémité du tube central; on restreint ainsi l'arrivée du gaz, ce qui se traduit par une diminution dans la hauteur de la flamme. En tatonnant un peu, on arrive à régler exactement l'étuve. A ce moment, on place un bouchon, traversé par un tube de verre, dans l'orifice qui surmonte l'étuve et qui communique avec le matelas d'eau. Lorsque la température s'élève, elle dilate l'eau, qui monte dans le tube de verre. La pression éprouvée par la membrane augmente et cette membrane se rapproche du tube d'arrivée du gaz, dont le débit se trouve diminué. L'étuve vient-elle par contre à se refroidir, la pression sur la lame élastique diminue; le gaz circule plus librement et la flamme des brûleurs s'exhausse parallèlement.

Le principal inconvénient du régulateur de d'Arsonval est le suivant. Si l'on fait usage d'une membrane de caoutchouc, celle-ci se fatigue très rapidement; si l'on s'adresse à une lame métallique, on diminue notablement la sensibilité du régulateur.

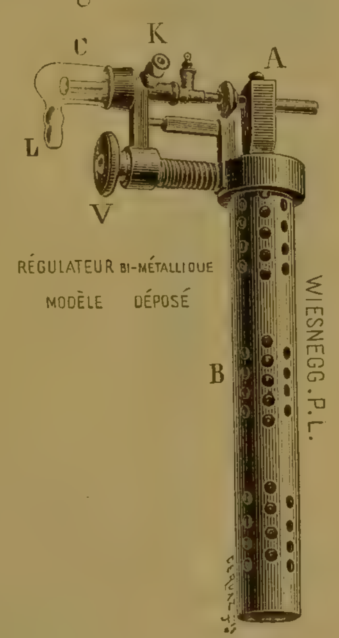


FIG. 79. — Régulateur de Roux (étuves à eau).

C. Régulateur de Roux.

Le régulateur de Roux (fig. 79 et 80) est constitué par deux lames, l'une de zinc, l'autre d'acier soudées ensemble et constituant un appareil tantôt rectiligne (étuves à eau) tantôt recourbé en U (étuves à air). Dans le modèle en U, que nous prendrons comme type de description, le zinc, plus

dilatable, se trouve placé en dehors ; de cette façon toute élévation de température tend à rapprocher les deux branches et tout abaissement à les écarter. Une tige rigide transmet ces mouvements à un piston qui commande l'arrivée du gaz. Celui-ci, avant de se rendre aux brûleurs, doit en effet passer au-dessous du piston. Lorsque la température de l'étuve s'élève, le mouvement transmis au piston a pour résultat de diminuer le débit du gaz ou même de l'interrompre ; le gaz ne parvient dans ce dernier cas aux brûleurs que par un trou de sûreté. Lorsque la température s'abaisse, le piston, refoulé en sens inverse, permet au contraire une arrivée de gaz de plus en plus grande. Le piston est actionné lui-même par une vis, ce qui rend aisé le réglage de l'appareil. Celui-ci s'opère de la façon suivante : le tube d'arrivée est relié à la conduite et le tube de sortie aux brûleurs. La vis est amenée au contact de la tige qui commande le piston et on repousse ensuite cette tige (en faisant jouer la vis) de façon que le gaz

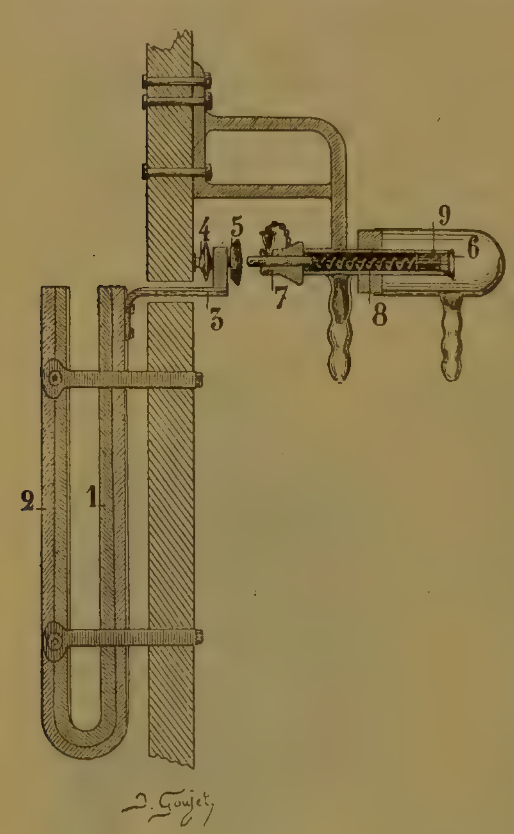


Fig 80. — Régulateur de Roux (étuves à air).

circule librement. Les brûleurs sont alors allumés. Lorsque le thermomètre indique une température légèrement inférieure à celle qu'on désire obtenir, on diminue l'arrivée du gaz en agissant sur la vis en sens inverse, jusqu'à ce que les brûleurs maintiennent la température voulue.

Les trois types de régulateurs que nous venons de mentionner ne peuvent fonctionner, rappelons-le, que si la pression du gaz est absolument constante et que si les écarts de température extérieure ne sont pas trop considérables.

Nous mentionnerons, en terminant, les *chambres-étuves,* usitées dans les grands laboratoires et chauffées tantôt à l'air chaud, tantôt à l'eau chaude.

CHAPITRE VIII

SÉPARATION ET ISOLEMENT DES MICROBES AÉROBIES

Le milieu extérieur, les aliments, etc... se trouvent peuplés de micro-organismes, dont il n'est indifférent de connaître ni le nombre ni la qualité. De même, dans les produits pathologiques, l'organisme pathogène est fréquemment accompagné d'autres microbes, soit saprophytes, soit pathogènes eux aussi (infections combinées, infections secondaires). Il est indispensable, pour étudier tous ces organismes, de pouvoir les séparer les uns des autres, de les isoler, comme on dit, à l'état de pureté. Les méthodes de séparation peuvent se proposer 3 buts différents : compter les germes, les séparer, ou enfin isoler une espèce déterminée. Nous étudierons successivement ces trois opérations, puis nous dirons quelques mots du repiquage des colonies.

1° *Numération des germes.*

Le type de cette méthode est fourni par le procédé d'analyse des eaux de M. Miquel. Il consiste essentiellement à faire des dilutions successives et à ensemencer, dans des milieux liquides ou solides, la dernière de ces dilutions. On peut y arriver de diverses façon. Soit à compter les microbes contenus dans un centimètre cube d'eau. Nous aspirons l'eau dans

une pipette donnant, par exemple, 50 gouttes au centimètre cube et nous en laissons tomber une goutte dans un tube renfermant 10 centimètres cubes d'eau stérilisée. Nous agitons, pour bien répartir les germes. Chaque goutte de ce premier tube contient 50 × 10 = 500 fois moins de germes que la goutte d'eau primitive. Transportons une telle goutte dans un second tube renfermant, lui aussi, 10 centimètres cubes d'eau stérilisée et ainsi de suite. Nous finirons par diluer tellement les germes, qu'une goutte du contenu d'un tube donné ne renfermera plus qu'un seul germe. On en est averti lorsque, sur une série de tubes de bouillon (10 par exemple), qui ont reçu chacun une goutte du contenu de ce dernier tube, quelques-uns seulement, mis à l'étuve, donnent naissance à un développement microbien. A ce moment, un calcul très simple permet d'obtenir le nombre de micro-organismes que contenait le centimètre cube d'eau primitif.

Il y a économie de temps et de travail à pratiquer l'ensemencement terminal en milieu solide, plutôt qu'en milieu liquide. Reprenons l'exemple précédent. Une goutte, provenant d'une dilution *moins étendue* que tout à l'heure, est prélevée avec la pipette indiquée, et versée dans une boîte de Petri ou une fiole de Gayon, qui contiennent de la gélatine (plus rarement de la gélose) liquéfiée. A l'aide d'une série d'oscillations latérales, on mélange intimement la goutte au milieu. Puis on fait faire rapidement prise à celui-ci. Les micro-organismes qui lui ont été incorporés se développeront alors *in situ*. Si la dilution a été poussée assez loin pour que les germes soient nettement séparés les uns des autres, chacun donnera naissance à une colonie isolée. Ces colonies pourront être comptées facilement et, à l'aide d'une simple multiplication, on aura le nombre des bactéries ren-

fermées dans le centimètre cube d'eau qu'on se proposait d'analyser.

Au lieu d'employer une pipette qui débite un nombre donné de gouttes par centimètre cube, on peut recourir à une série de tubes gradués, contenant chacun 9 centimètres cubes d'eau stérile. Avec une pipette jaugée on verse dans le premier tube 1 centimètre cube de l'eau à analyser. On agite, on transporte 1 centimètre cube de cette première dilution dans un second tube et ainsi de suite. Nous retrouverons plus tard ce procédé (Voir : Analyse des eaux).

2° *Séparation proprement dite.*

On peut séparer les microbes par dilution et les ensemencer ensuite, soit sur des milieux solidifiables (plaques de gélatine ou de gélose), soit sur des milieux solides. On peut faire également une « séparation par épuisement » sur milieu solide ou un épuisement suivi d'ensemencement en plaques. Étudions ces quatre procédés l'un après l'autre.

A. Séparation par dilution, et ensemencement en plaques de gélatine ou de gélose.

a) **Procédé des plaques.** — Supposons le cas d'une culture en milieu liquide, d'abondance moyenne. Nous désirons séparer les différents germes qu'elle renferme. Après avoir bien agité cette culture, nous en prélevons une anse, d'environ un millimètre de diamètre et nous la diluons dans 1 centimètre cube d'eau stérilisée. Après agitation, une anse de la dilution est portée dans un tube de gélatine liquéfiée à une douce chaleur et les germes sont répartis dans la gélatine sans faire de bulles ; on y arrive en inclinant

puis en redressant brusquement le tube. La gélatine est alors coulée dans une boîte de Petri. Pour cela, on enlève le coton du tube à essai, on flambe l'orifice, on remet la ouate et on attend un instant que le tube soit refroidi ; on enlève à nouveau le coton, on soulève le couvercle de la boîte ; on verse la gélatine, qu'on répartit sur tout le fond en l'inclinant dans divers sens. La boîte doit ensuite être posée bien horizontalement sur une plaque refroidissante de Roux, ou tout au moins sur une surface froide, le plus horizontale possible. Lorsque la gélatine a fait prise, on étiquète et on porte à l'étuve à 22°. Quand l'opération est bien réussie, il pousse un très petit nombre de colonies.

Si la culture originelle est très abondante, on prélèvera seulement, pour faire l'ensemencement, la quantité qui peut adhérer à un fil de platine droit. Si elle est peu abondante, on ensemencera 2 anses, ou plus, de la dilution.

Lorsqu'on a affaire à une culture sur milieu solide, on commence par l'émulsionner dans de l'eau stérilisée, de façon à obtenir l'équivalent d'une culture moyennement abondante, avec laquelle on pratique une dilution comme plus haut. Enfin s'il s'agit d'un produit pathologique, la dilution initiale se fait d'après la richesse présumée en germes. Dans le doute, il vaut mieux recourir à la méthode par épuisement, suivie d'ensemencement en plaques.

Au lieu de gélatine, on peut employer la gélose. Il faut maintenir les tubes, où celle-ci a été fondue, à une température de 40° et couler dans des boîtes de Petri préalablement chauffées. Quand la gélose a fait prise, on met les boîtes à l'étuve à 37°, après les avoir retournées afin que l'eau de condensation ne souille pas les cultures.

b) **Méthode d'Esmarch.** — Le tube d'Esmarch pré-

sente sur la boîte de Petri l'avantage d'une contamination moins facile par les germes extérieurs, mais il a l'inconvénient d'être hors d'usage dès que les colonies liquéfiantes commencent à se développer. Prendre un tube contenant très peu de gélatine (1/2 travers de doigt environ) liquéfiée à une douce chaleur; l'ensemencer avec une dose double de celle qu'on emploierait pour une boîte de Petri. Flamber le coton et le repousser dans le tube. Capuchonner l'orifice et le fond. Étaler régulièrement la gélatine sur toute la surface interne du tube. Puis, pour faire prise, rouler ce tube à la surface d'une cuvette remplie d'eau fraîche (glacée même en été). Mettre enfin à l'étuve (22°). On évitera de tenir le tube tout à fait horizontal, sous peine de souiller le tampon de coton avec la gélatine, ce qui amènerait l'adhérence de ce tampon à la paroi.

B. Séparation par dilution, et ensemencement sur milieux solides.

Avec une anse de la dilution, préparée comme dans la méthode précédente, on ensemence la surface d'un tube de gélose ou de sérum, puis on porte à 37°. Les tubes peuvent être remplacés par des boîtes de Petri remplies du même milieu préalablement coagulé. Cette méthode est plus pratique que celle des plaques de gélose. Elle a sur celle des plaques de gélatine l'avantage de permettre la mise à l'étuve à 37°.

C. Séparation par épuisement sur milieux solides (gélose, sérum).

a) **Procédé de Roux et Yersin.** — La semence est étalée à la surface de 3 ou 4 tubes de gélose ou de

sérum, à l'aide d'un fil de platine ou d'une spatule. Les ensemencements sont pratiqués successivement, sans recharger le fil ou la spatule. Il s'ensuit que la semence s'épuise peu à peu et que le nombre des colonies obtenues dans les derniers tubes sera minime. Cette méthode est très commode lorsque la semence n'est pas riche en germes, ou encore lorsqu'on ensemence sur un milieu dont la constitution intervient pour limiter le nombre et les dimensions de la plupart des colonies obtenues, comme c'est le cas pour le diagnostic de la diphtérie. Si la semence est riche en germes, cette méthode cesse d'être pratique ; il convient alors de donner la préférence à la suivante, qui permet également la mise à l'étuve à 37°.

b) **Procédé de Veillon.** — On épuise successivement la semence dans l'eau de condensation de plusieurs tubes de gélose ou de sérum. Puis on incline ces tubes pour que l'eau de condensation elle-même vienne les ensemencer. Cette méthode tient à la fois de l'épuisement et de la dilution, puisque la totalité de la semence délayée n'est pas ensemencée à la surface du milieu solide. Dans le cas d'une semence riche en germes, on peut hésiter entre ce procédé et la séparation par dilution, suivie d'ensemencement sur gélose ou sur sérum. Cette dernière méthode présente l'avantage de ne nécessiter qu'un seul tube de milieu solide, mais il faut connaître à peu près la richesse de la semence. Le procédé Veillon exige 3 ou 4 tubes ; il permet par contre d'obtenir des colonies isolées, même lorsqu'on ignore le degré de richesse de la semence.

D. Séparation par épuisement, et ensemencement en plaques.

C'est la méthode originelle de Koch. On a devant

soi 3 ou 4 tubes de gélatine, liquéfiée à une douce chaleur. On ensemence le premier tube avec une petite quantité du produit à examiner, par exemple une goutte de produit liquide. La semence ayant été bien répartie dans la gélatine, on ensemence le deuxième tube avec 3 gouttes (environ) du premier ; le troisième avec 3 gouttes du second et ainsi de suite. On coule ensuite les 3 ou 4 tubes dans autant de boîtes de Petri, qu'on met à l'étuve à 22°. Il est évident que les quantités ensemencées dans le premier tube et les suivants varieront suivant la richesse présumée de la semence. Si l'opération est réussie, on verra la somme des colonies décroître de la première à la dernière boîte, pour atteindre dans celle-ci une proportion convenable.

Cette méthode est indiquée lorsqu'on conserve un doute sur la teneur en germes d'un produit donné ; dans le cas contraire, mieux vaut recourir aux méthodes qui ne nécessitent l'emploi que d'un seul tube de milieu de culture. On peut remplacer, bien entendu, la gélatine par la gélose.

3° *Isolement.*

Les méthodes d'isolement des micro-organismes varient beaucoup avec les différentes espèces. Il est donc impossible de décrire un procédé qui soit de mise en toute circonstance. Il convient au contraire, dans chaque cas particulier, de s'inspirer des propriétés biologiques du microbe qu'on désire isoler. Il faut alors avoir présentes à l'esprit les données suivantes :

On tirera parfois un parti avantageux de ce que certaines espèces ne se développent pas au contact de l'air (les méthodes indiquées plus haut permettent d'éliminer complètement toutes les bactéries stricte-

ment anaérobies). On pourra utiliser aussi la propriété que présentent quelques microbes de pousser très rapidement à la surface de certains liquides nutritifs. C'est ainsi que la méthode d'isolement du vibrion cholérique, dans les cas difficiles, est basée sur son développement précoce à la surface de l'eau peptonisée et gélatinisée.

Certains milieux sont, de par leur réaction, ou de par leur composition chimique, favorables à la croissance d'espèces données. On conçoit qu'un procédé d'isolement puisse être emprunté à cette particularité. Ainsi, on choisira les milieux acides pour l'isolement des levures et des moisissures, les milieux très alcalins pour celui des ferments de l'urée. Des milieux peu nutritifs conviennent exclusivement pour l'isolement de quelques microbes : du nitrosococcus, du nitrosomonas par exemple. On utilisera encore ce fait que la réaction ou composition chimique de certains milieux sont défavorables à la croissance de la majorité des espèces qui accompagnent le microbe qu'on désire obtenir. La légère acidité du milieu d'Elsner, et l'iodure de potassium qu'il renferme, arrêtent le développement d'un grand nombre de micro-organismes et n'entravent ni celui du b. coli ni celui du b. d'Eberth. L'addition d'acide phénique au bouillon ou à la gélose produit exactement le même effet (Chantemesse et Widal).

D'autres fois, on se souviendra que certains germes sont susceptibles de se développer à une température très basse ou très élevée, à laquelle les organismes concomitants ne poussent point. Nous rappellerons comme exemple les bactéries frigoriphiles, qui croissent au-dessous de 10° et notamment aux environs de 0°, et les bactéries thermophiles, qui se cultivent de 50° à 70°. Sans aller aussi loin, on sait que la plupart des microbes des eaux, des levures et des moisissures

se développent à une température sensiblement inférieure à celle de la masse des microbes pathogènes et qu'inversement le b. coli et le b. d'Eberth, par exemple, croissent encore à 42° et au delà.

Nous devons insister ici sur l'importance du principe des cultures fractionnées, principe introduit pour la première fois dans la science par Pasteur, lors de ses recherches sur l'obtention des levûres à l'état de pureté. Que l'on réalise les meilleures conditions de culture pour le microbe qu'on se propose d'isoler, ou que l'on réalise les plus mauvaises conditions de culture pour ceux qui l'accompagnent, il n'en faut pas moins répéter presque toujours les ensemencements, en faisant, chaque fois, un certain nombre de cultures de passage, avec des fractions minimes de la culture antécédente. Souvent même, ces passages seront insuffisants et on devra terminer par une séparation.

On pourra se servir exceptionnellement de milieux défavorables au microbe qu'on veut isoler et favorables au contraire aux autres micro-organismes. C'est la méthode d'ensemencement négatif, usitée par M. Winogradski pour isoler les ferments nitreux.

On connaît la résistance des spores à la chaleur. Si le microbe qu'on désire isoler forme des spores, on peut chauffer aux environs de 100° (d'ordinaire 20 minutes à 90°) le produit qui le renferme. L'ensemencement en bouillon du produit chauffé donnera une culture pure (à moins que deux espèces sporulées ne coexistent, comme c'est le cas pour le vibrion septique et le bacille tétanique dans le sol). C'est le procédé utilisé par Pasteur pour l'isolement de la spore charbonneuse et par M. Vaillard pour l'isolement de la spore tétanique. C'est le procédé classique, pour obtenir des cultures pures de b. subtilis. On s'adressera donc, soit à une culture (impure) en milieu liquide, soit à une émulsion en eau stérilisée d'une

culture solide ou d'un produit quelconque (également impurs) ; on les aspirera dans une ampoule de verre, préparée extemporanément avec une pipette Pasteur. On portera au bain-marie à la température et pendant le temps voulus. Le chauffage terminé, il suffit de briser une des extrémités de l'ampoule, de puiser son contenu et de l'ensemencer dans un milieu approprié.

On peut dans certains cas inoculer, à un animal particulièrement sensible au microbe en jeu, le produit complexe qui renferme ce microbe. C'est ainsi qu'on injectera à la souris un crachat d'où on veut séparer le pneumocoque à l'état de pureté, au cobaye un produit qui contient le bacille de Koch, au cobaye également la terre d'où on désire isoler le vibrion septique. Ces microbes se développent souvent seuls dans l'organisme de l'animal et il est facile de les retrouver à l'autopsie, M. Gottschlich inocule de même, dans le péritoine d'un cobaye, des crachats pesteux ; si le cobaye n'est pas mort au bout de 24 heures on fait une prise dans le péritoine et on ensemence. Enfin, le procédé de Veillon se propose d'isoler à la fois plusieurs microbes pathogènes contenus dans un produit. Celui-ci est inoculé sous la peau, chez un animal réceptif, et l'on fait des prises successives *loco læso*. Supposons le cas d'un exsudat amygdalien (non diphtérique). On le dilue dans de l'eau stérilisée et on l'inocule à une souris ou à un lapin. Les microbes pathogènes se développent rapidement ; le lendemain, et au besoin aussi le surlendemain, on prélève un peu de l'exsudat local, avec lequel on fait des séparations par les moyens habituels.

On est parfois appelé à utiliser simultanément plusieurs des procédés que nous venons de décrire. C'est ainsi que M. Vincent, pour isoler d'une eau le bacille typhique, a projeté jadis d'ensemencer cette eau

dans un bouillon phéniqué (procédé Chantemesse et Widal) et de porter ensuite à 43° (procédé Rodet). Plus souvent encore on se verra obligé de recourir, comme nous l'avons déjà dit, aux méthodes de séparation habituelles, pour mener à bien un isolement qui sera demeuré incomplet.

On le voit, les méthodes de numération et de séparation des micro-organismes représentent des procédés surtout mécaniques ; les méthodes d'isolement constituent au contraire des procédés essentiellement biologiques.

4° *Repiquage.*

Lorsque les colonies ont fait leur apparition sur le milieu nutritif qui a servi à les séparer, on commence par rechercher celles qu'on se propose d'étudier. Pour cela il est bon, surtout si elles sont encore peu développées, d'avoir recours à une forte loupe ou mieux encore, dans le cas des boîtes de Petri, au microscope. On place la boîte sur la platine, le fond tourné en haut et on passe en revue les diverses colonies qu'elle contient. On se sert pour cela d'un objectif faible : le grossissement est toujours suffisant, néanmoins, pour permettre de reconnaître à leur configuration les colonies de beaucoup de microbes. Lorsqu'on a trouvé la colonie cherchée, on en prélève une trace avec le fil de platine. Si l'amas est suffisamment volumineux, il suffit, après avoir ouvert la boîte, de le toucher avec l'extrémité du fil. S'il est trop petit, c'est sous le microscope que doit se faire la prise de semence. La boîte ouverte est alors placée sur la platine, le fond regardant en bas. On met au point et, l'œil n'abandonnant pas l'oculaire, on conduit le fil de platine au-dessus et à quelque distance de la colonie. Lorsqu'il est bien fixe dans cette posi-

tion, on l'abaisse avec précaution pour l'amener au contact de l'amas microbien. Cette opération, assez délicate, sera rendue très facile si, en même temps qu'on abaisse le fil, on lui imprime de petits mouvements latéraux alternatifs. Avec les germes prélevés par le fil, on commence par faire des préparations microscopiques. Si la colonie apparaît pure et si rien ne permet de soupçonner le mélange d'un microbe étranger même à l'état d'unités, on repique immédiatement dans tel ou tel milieu. Dans le cas contraire, le repiquage doit être précédé d'une purification, ou nouvelle séparation. Avec le fil, rechargé de semence, on fait alors un certain nombre de stries sur deux ou trois tubes de gélose (ou éventuellement de sérum coagulé). Dans les derniers tubes, les colonies pousseront isolées. Il suffira de les vérifier et de les repiquer définitivement. La gélose est à préférer ici à la gélatine, parce qu'elle permet la mise à l'étuve à 37° et par conséquent le développement plus rapide des organismes.

Dans le cas du tube d'Esmarch, l'examen et le prélèvement des colonies se font de façon très analogue. Le tube peut, comme la boîte de Petri, être porté sous le microscope et examiné à un faible grossissement. Le prélèvement s'effectue avec un fil de platine ordinaire. On applique la monture de celui-ci contre le bord de l'ouverture du tube, ce qui fournit un point d'appui pour la manipulation.

Remarquons encore que lorsqu'on fait des prélèvements en été, on aura soin de refroidir les cultures en gélatine avant tout examen un peu prolongé.

CHAPITRE IX

CULTURE ET SÉPARATION DES MICROBES ANAÉROBIES

1. *Généralités.*

Pendant longtemps l'oxygène de l'air avait été regardé comme indispensable à la vie des êtres. Ce fut Pasteur qui démontra le premier que certains organismes, le ferment butyrique, divers microbes de la putréfaction, le vibrion septique..., etc., non seulement pouvaient vivre à l'abri de l'air, mais encore n'étaient pas susceptibles de végéter en sa présence. Il signala le dégagement de gaz comme caractéristique de la vie de tous ces microbes, auxquels il donna le nom d'anaérobies. Il montra que les gaz formés sont inflammables et se composent généralement d'acide carbonique, d'hydrogène et d'hydrogène carboné. Cette remarque, que les anaérobies dégagent des gaz, le conduisit à considérer les fermentations comme intimement liées à la vie sans air. Les deux phénomènes ne sont pas en réalité dans une dépendance aussi absolue, mais ils marchent si souvent de pair qu'on conçoit pourquoi Pasteur avait voulu les identifier.

Les microbes ne sont pas tous exclusivement aérobies ou anaérobies. Certains d'entre eux, le b. aceti, le b. subtilis, le b. mesentericus, le b. du charbon représentent, il est vrai, des aérobies stricts. Ils forment des voiles à la surface des liquides (b. aceti, b. subtilis, b. mesentericus) ou, s'ils se développent

dans leur profondeur, ils le font d'autant mieux que la solution nutritive est plus aérée et disposée en couche plus mince (b. charbonneux). D'autres, le ferment butyrique, le vibrion septique, le b. Chauvœi, divers microbes de la putréfaction, sont exclusivement anaérobies. Ils ne végètent jamais en présence de l'oxygène, celui-ci étant pour eux un véritable poison. Ils ne poussent que dans le vide ou les gaz inertes. Mais, entre ces deux extrêmes, il y a place pour de nombreux microbes aéro-anaérobies qui se développent à la fois à l'abri de l'air et à son contact. Tel est le cas de la levûre de bière et du plus grand nombre des bactéries courantes.

Certains microbes anaérobies peuvent s'habituer à vivre à l'air lorsqu'on les ensemence en cultures de plus en plus aérées. Ainsi, par exemple, pour le bacille de Nicolaïer, que l'un de nous est arrivé à faire pousser aérobiquement presque aussi aisément que la bactéridie charbonneuse.

Les microbes anaérobies sont très nombreux. La liste s'en est considérablement accrue dans ces dernières années avec les travaux de M. Veillon et de ses collaborateurs ou élèves (Zuber, Hallé, Rist, Cottet, Guillemot). Il en est dans l'eau, le sol, les poussières. Il en est dans l'organisme humain ou animal à l'état normal (vibrion septique, bacille du tétanos) ou pathologique (maladies diverses, gangrènes, suppurations). Si on analyse, par les méthodes ordinaires, un échantillon d'eau, de poussières, de pus, ces microbes passent tout à fait inaperçus. Il faut, pour les déceler une technique très spéciale, que nous devons maintenant étudier.

II. *Methodes de culture.*

Un grand nombre de méthodes peuvent être em-

ployées pour cultiver les anaérobies. Mais, tout d'abord, comment sera-t-on averti qu'un milieu ne renferme pas d'oxygène libre ? A l'aide d'une solution d'indigo blanc, laquelle se prépare en faisant tomber, dans une solution de sulfo-indigotate de soude, un peu d'hydrosulfite de soude. Si le milieu contient de l'oxygène, l'indigo blanc repasse à l'état d'indigo bleu ; s'il n'en contient pas, la teinte blanche persiste. On est averti de même que les colonies anaérobies vont apparaître lorsqu'on a teinté les milieux de culture avec l'indigo bleu. En se développant, les microbes empruntent de l'oxygène à la matière colorante, qui se réduit et passe à l'état de leuco dérivé.

Nous diviserons les procédés de culture des anaérobies en quatre groupes : procédés basés sur l'emploi de l'ébullition — procédés basés sur l'emploi des gaz inertes — procédés basés sur l'emploi du vide — procédés basés sur l'emploi de corps ou de microbes susceptibles d'absorber l'oxygène.

1° Méthodes basées sur l'emploi de l'ébullition.

Elles sont applicables à la fois aux cultures liquides et aux cultures solides. Voici les principaux moyens auxquels on pourra recourir.

A) On fait bouillir pendant quelques instants le bouillon d'un tube à essai et on l'aspire dans une petite pipette qu'on a étranglée au-dessous du tampon d'ouate. On ferme la pointe, puis l'étranglement dans une flamme et on met pendant 24 heures à l'étuve, afin de permettre d'absorber les traces d'oxygène qui restent. Pour ensemencer, on ouvre la pipette à sa partie supérieure. On introduit la semence et on referme dans la flamme, en faisant bouillir le som-

met de la colonne liquide. On chasse ainsi la faible quantité d'air qui a pu s'introduire. La culture une fois développée, on y fait des prises de la façon suivante : on fond le verre à l'extrémité supérieure de la pipette, afin de produire un petit orifice par lequel s'échappent les gaz, et on coupe le tube un peu au-dessous avec un couteau à verre.

B) Un procédé plus simple encore consiste à porter à l'ébullition un tube de bouillon, à recouvrir sa surface avec de l'huile stérilisée, puis à l'ensemencer, après l'avoir brusquement refroidi, à l'aide d'une pipette effilée contenant une certaine quantité de semence sous forme liquide ; on évitera avec soin d'introduire de l'air en soufflant. La plupart des auteurs conseillent, pour la culture des anaérobies, l'usage exclusif du bouillon frais. Cette exigence ne nous paraît nullement justifiée. M. Debrand a montré d'ailleurs que le b. de Nicolaïer se développait tout aussi bien et fabriquait d'aussi bonne toxine dans les bouillons anciens que dans les bouillons récents.

C) Si on désire faire la culture dans la gélatine ou dans la gélose, on liquéfiera celles-ci, puis on les soumettra à l'ébullition pendant quelques minutes. On aspirera le milieu nutritif dans une pipette étranglée, dont on fermera ensuite la pointe dans la flamme. On solidifiera rapidement sous un courant d'eau. On enlèvera le coton qui surmonte l'étranglement et on ensemencera par piqûre. On fermera enfin au niveau de l'étranglement.

D) On peut aussi prendre un tube de gélatine, rempli à 4 travers de doigt, faire bouillir celle-ci, la solidifier brusquement dans l'eau froide et l'ensemencer par piqûre à l'aide d'un fil de platine très allongé. On coulera un bouchon de gélose au-dessus du cylindre de gélatine (bien refroidi) afin d'empê-

cher l'accès ultérieur de l'oxygène de l'air. On peut faire également des cultures par piqûre dans la gélose. Il est utile ici, comme dans les procédés qui vont suivre, d'additionner la gélatine ou la gélose de quelques gouttes d'une solution de sulfo-indigotate de soude, qui virera au jaune dans les points correspondant au développement des micro-organismes. Il y a intérêt également à additionner les milieux de sucres fermentescibles ; le bouchon de gélose devient alors inutile.

2° Méthodes basées sur l'emploi des gaz inertes.

D'autres méthodes de culture sont basées sur l'usage de gaz inertes, tels que l'hydrogène, l'acide carbonique, l'azote, le gaz d'éclairage. L'azote, d'une préparation difficile, n'est, pour cette raison, presque jamais employé dans les laboratoires. Toutefois le procédé de Buchner (ubi infra) revient à cultiver les anaérobies en présence d'azote et d'une trace d'acide carbonique. Le gaz d'éclairage serait d'un emploi extrêmement pratique, si un grand nombre de produits qui entrent dans sa constitution n'étaient doués de propriétés nocives vis-à-vis des micro-organismes. L'acide carbonique est habituellement écarté de la technique bactériologique, en raison de son pouvoir antiseptique indéniable. L'hydrogène demeure donc le gaz de choix. Il se prépare très simplement à l'aide de l'appareil de Roux que représente notre schema (fig. 81). Cet appareil se compose de deux flacons de cinq litres de capacité environ, communiquant entre eux et renfermant, l'un de l'acide sulfurique dilué, l'autre des rognures de zinc disposées sur du verre pilé. L'acide sulfurique doit être employé après qu'on l'a étendu peu à peu de 4 à 5 volumes d'eau. Il ne

sera versé dans l'appareil que lorsqu'il est bien refroidi. Quand on se sert de zinc pur, il faut savoir que la réaction chimique ne pouvant pas s'amorcer, l'hydrogène ne se dégage pas. Le cas échéant, il n'y aurait qu'à verser dans le flacon quelques gouttes d'une solution de sulfate de cuivre. La réaction se manifeste alors immédiatement. Quand on a terminé une opération, on ferme le robinet et la pression du gaz, dans le vase qui contient le zinc, fait refluer l'acide dans l'autre flacon. Pour amorcer à nouveau

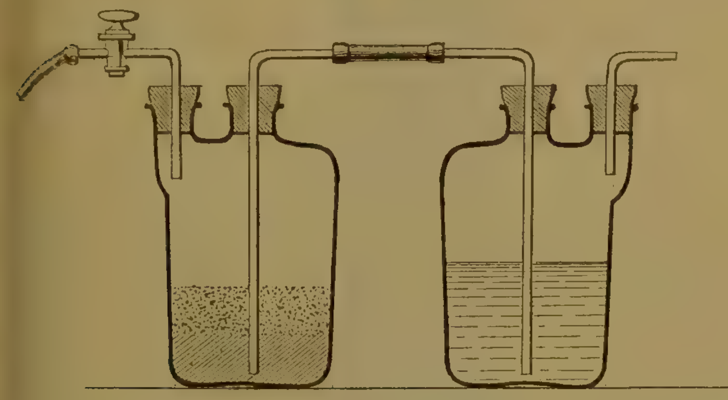


FIG. 81. — Appareil de Roux pour la production de l'hydrogène.

la réaction, il suffit de souffler dans le tube qui termine l'appareil. L'hydrogène produit passera, avant de se dégager, à travers deux flacons laveurs, disposés à côté des vases qui contiennent le zinc et l'acide, dans la même boîte de bois. Le premier de ces flacons renferme du permanganate de potasse avec un peu d'acide sulfurique, le second du permanganate de potasse en solution fortement alcaline. L'hydrogène se débarrasse en les traversant de toutes les impuretés (hydrogènes carboné, arsénié, phosphoré, sulfuré) provenant de l'acide sulfurique ou du zinc (Schobig).

Il va de soi que le volume de l'appareil à hydrogène doit être, autant que possible, proportionné au volume des récipients où doivent se faire les cultures. Si l'on désirait cultiver les anaérobies en grand, l'emploi d'un gazomètre pourrait devenir indispensable.

Les méthodes basées sur l'usage exclusif des gaz inertes sont rarement usitées seules. On associe généralement l'emploi du gaz à celui du vide.

3° Méthodes basées sur l'emploi du vide.

On peut s'adresser pour faire le vide : soit à la pompe à mercure d'Alvergniat, soit à la trompe à eau. La pompe à mercure a l'avantage de donner un vide parfait, à tel point qu'il est à peu près inutile de faire passer ensuite un courant d'hydrogène ; mais c'est un appareil fragile, coûteux, d'un maniement lent et délicat. Il en existe toutefois un petit modèle (fig. 82), spécialement destiné aux laboratoires de bactériologie, et amplement suffisant pour la culture des anaérobies. Le récipient qui renferme la culture est relié à la branche horizontale de l'appareil par l'intermédiaire d'un tube de caoutchouc Martin. Ce caoutchouc, avons-nous déjà dit, a juste l'épaisseur voulue, il est souple, se manie facilement et se montre de beaucoup préférable au caoutchouc à vide ordinaire. On fait le vide jusqu'à obtenir l'égalité de niveau du mercure dans les deux branches du manomètre qui surmonte la branche horizontale. Sur le milieu de cette dernière, se trouve emmanché un tube vertical, commandé par un robinet et communiquant avec le générateur d'hydrogène. Si donc on jugeait à propos de pratiquer un rinçage à

l'hydrogène, on ouvrirait le robinet et on laisserait

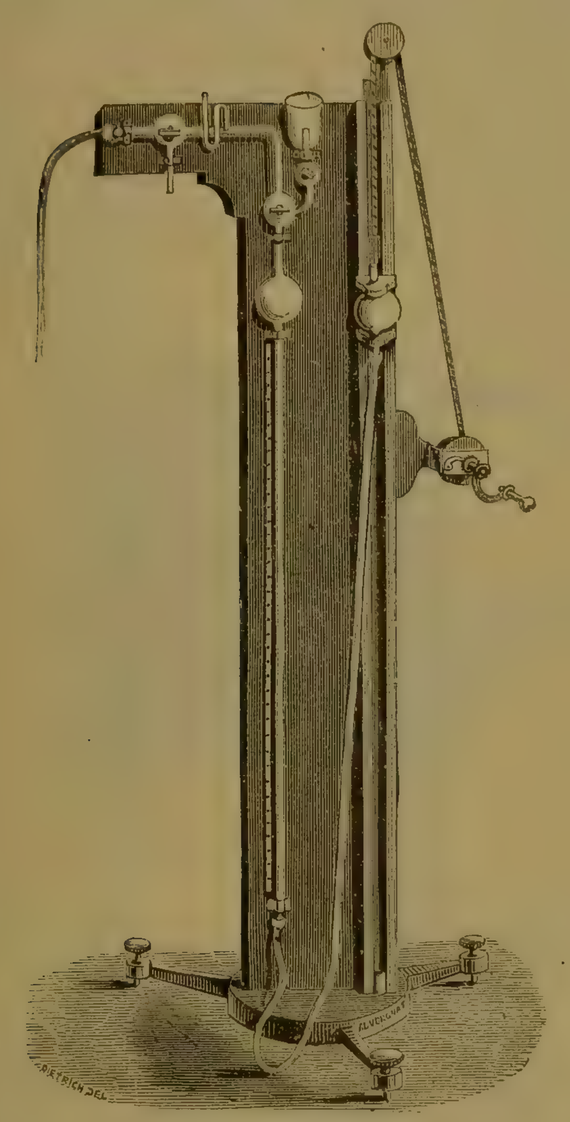


Fig. 82. — Pompe à mercure d'Alvergniat (petit modèle).

pénétrer le gaz au sein du vase de culture jusqu'à ce

que, dans le manomètre, le mercure fût revenu au niveau qu'il occupait au début de l'opération. Puis, on ferme le robinet ; on fait de nouveau le vide et on recommence ainsi une ou deux fois. On termine enfin l'opération en scellant à la lampe le tube qui termine le vase de culture.

La trompe à eau (fig. 83-84) est d'un prix plus modique et d'un maniement plus facile et plus rapide. Mais le vide que donne cet appareil demeure

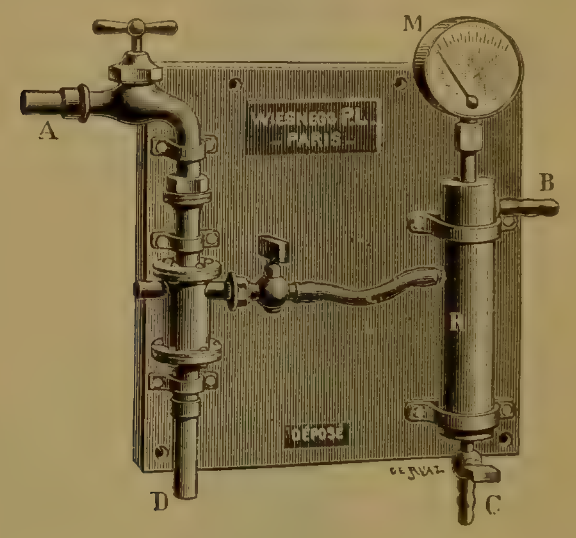


Fig. 83. — Trompe métallique.

très relatif et d'une façon générale il faut recourir au rinçage à l'hydrogène. Les trompes métalliques (celle de Golaz par exemple) sont munies le plus souvent d'un robinet de sûreté, empêchant le reflux de l'eau et même d'une soupape de sûreté, pour le cas où l'on aurait omis de fermer le robinet. Lorsqu'on emploie une simple trompe de verre d'Alvergniat, non montée, il faut suppléer au robinet en plaçant une pince à pression sur le caoutchouc qui relie la trompe

au vase de culture. On fera bien de suppléer aussi à la soupape en interposant, entre la pince et le vase de culture, un petit ballon rond bitubulé, destiné à recevoir l'eau qui pourrait refluer accidentellement.

On sait que le fonctionnement des trompes exige une pression d'au moins 10 à 11 mètres d'eau ; quand la pression est inférieure, il faut allonger le tuyau de chute. Rappelons enfin que toute trompe doit être munie d'un indicateur du vide.

On disposera les vases de culture de telle façon qu'ils puissent être mis en relation tantôt avec la trompe, tantôt avec le générateur d'hydrogène. Ceci posé, voici comment on procède. On supprime d'abord toute communication entre le vase de culture et le générateur d'H. On ouvre le robinet de la conduite d'eau, puis le robinet de sûreté. On suit des yeux l'aiguille de l'indicateur du vide. Lorsque le vide a été poussé à son maximum, on interrompt toute communication avec la trompe (en fermant d'abord le robinet de sûreté, puis celui de la conduite d'eau). On fait pénétrer l'H dans le vase de culture : l'aiguille de l'indicateur tombe immédiatement à zéro. On interrompt

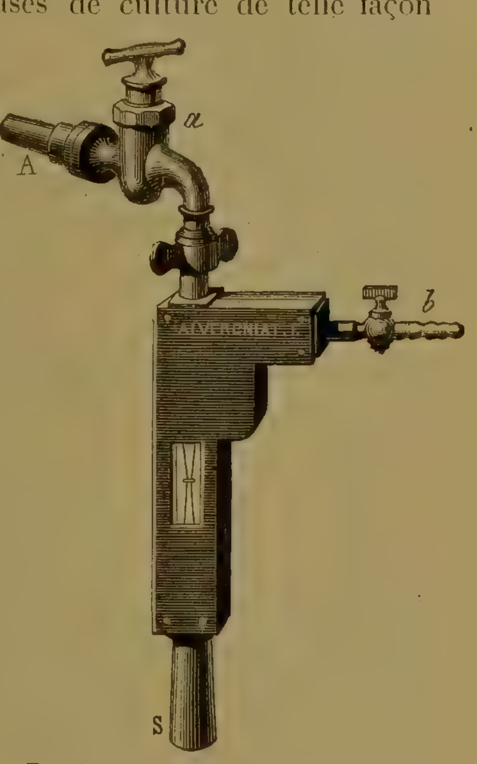


Fig. 84. — Trompe d'Alvergniat, avec monture en fonte et robinet de sûreté.

alors la communication avec le générateur d'H. On fait le vide, etc... Après avoir répété trois ou quatre fois les mêmes opérations on scelle à la lampe, sous le vide ou dans l'hydrogène, l'extrémité de l'appareil de culture.

Les vases dans lesquels on désire faire le vide seront choisis suffisamment résistants; ils ne doivent être remplis de liquide qu'aux 2/3 environ. Il est bon de façonner en olive le tube de verre terminal qu'on doit enfoncer dans le caoutchouc Martin; cette disposition facilite beaucoup son adaptation et empêche la déchirure du caoutchouc. On aura bien soin de ne pas manier trop brusquement les appareils, afin d'éviter de briser les étranglements qu'ils portent. On veillera enfin à ce que les tampons de ouate dont ils sont munis ne soient jamais humides. Le cas échéant, on les sécherait avec soin à la flamme d'un dard de gaz.

Ces recommandations générales étant faites, indiquons maintenant les principaux procédés basés sur l'emploi du vide, combiné ou non à celui des gaz inertes :

A) Le procédé le plus simple consiste encore à se servir de la *pipette Pasteur*. Sur une pipette ordinaire, on pratique un étranglement à quelque distance du tampon de coton. On repousse celui-ci jusqu'à ce niveau et on pratique un second étranglement au-dessus. Un tube de bouillon a été préalablement ensemencé avec le microbe destiné à être cultivé dans le vide. On plonge dans ce tube l'extrémité ouverte et flambée de la pipette; on aspire, en ayant soin que le liquide ne monte pas jusqu'au niveau de l'étranglement inférieur. On ferme l'effilure à la lampe. Il suffit dès lors d'adapter l'extrémité supérieure de la pipette au caoutchouc de la trompe ou de la pompe à mercure. L'opération terminée, on fond à la flamme

l'étranglement supérieur de la pipette. On met de la cire Golaz aux deux extrémités de l'ampoule ainsi produite, afin de consolider les effilures et de les protéger contre les chocs et contre la fissuration, puis on porte à l'étuve.

On conçoit, sans qu'il soit nécessaire d'insister, la façon dont devront se faire les prélèvements dans un tube de culture ainsi constitué. Ajoutons que lorsqu'on emploie les pipettes Pasteur, on peut se passer du lavage à l'hydrogène. On se contentera de lécher avec une flamme de gaz les parois du tube pendant que fonctionne l'appareil à vide. Une très légère élévation de la température permet d'obtenir sous pression réduite l'ébullition du bouillon, qui se trouve ainsi purgé d'air de façon très suffisante. Une bonne précaution consiste aussi à chauffer légèrement la paroi de la pipette à sa partie supérieure. Les bulles de gaz qui se forment dès que l'air se raréfie, viendront crever au contact du verre chaud et on ne risque pas de voir le liquide entraîné vers le bouchon d'ouate. Ajoutons qu'il y a le plus souvent avantage à se servir de grosses pipettes du volume d'un tube à essai environ, car les pipettes Pasteur ordinaires contiennent trop peu de liquide pour les besoins ordinaires. On pourra aussi remplacer les pipettes par des ballons, lorsqu'on a affaire à de grandes masses de liquide (préparation de la toxine tétanique ou botulique par exemple).

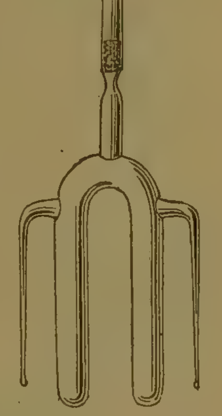


Fig. 85. — Tube double de Pasteur.

B) Le *tube double de Pasteur* (fig. 85) consiste dans un tube à deux branches à la partie supérieure duquel se trouve soudé un petit tube de verre étranglé et muni d'un tampon de coton ; chacune des

deux branches porte latéralement une effilure. On commence par pratiquer un second étranglement au-dessus de la bourre d'ouate et par terminer en olive la partie libre. Il est recommandé aussi de dévier un peu en dehors les deux effilures. L'appareil étant stérilisé, on puise la semence, diluée dans le bouillon stérile d'un tube à essai. Pour cela, le prolongement effilé d'un des tubes latéraux est coupé; on flambe sa surface extérieure et on laisse refroidir; enfin on aspire dans la branche correspondante de l'appareil le liquide ensemencé. Puis, on flambe à nouveau l'effilure et on ferme son extrémité à la lampe. L'autre branche est remplie de la même façon, mais avec du bouillon neuf qui servira de



Fig. 86. — Tube simple de Pasteur.

témoin pendant les premiers jours et qui pourra ensuite, grâce à une légère oscillation de l'appareil, être ensemencé par le liquide de la première branche. Le *tube simple de Pasteur* (fig. 86) diffère uniquement du précédent par l'absence de la branche témoin.

Double ou simple, le tube de Pasteur est adapté à la pompe à mercure ou à la trompe à eau. Le vide peut être ou non suivi d'un lavage à l'hydrogène. L'opération terminée, on ferme à la lampe au-dessus du tampon d'ouate. De même que pour la pipette Pasteur, on peut se passer du rinçage à l'hydrogène si, pendant la manœuvre du vide, on prend soin de lécher avec une petite flamme les deux branches du tube et de chasser ainsi par l'ébullition à une basse température tout l'air de la culture. Néanmoins nous conseillons, toutes les fois que cela sera possible,

d'associer les deux méthodes. Lorsqu'on désire faire une prise à l'intérieur du tube simple ou double, il faut briser au-dessus du tampon de coton le col de l'appareil et laisser rentrer l'air qui, filtré sur ce tampon, pénétrera dépourvu de germes. On flambe l'effilure latérale, qu'on ouvre ensuite et on refoule dans un tube stérile la quantité de culture qu'on veut prélever. Si, après ce prélèvement, la culture doit continuer encore, il faut recommencer la manipulation indiquée.

C) Les procédés de la pipette et du tube Pasteur ne sont applicables, on le conçoit, que lorsqu'il s'agit d'obtenir une petite quantité de culture. Si on désire cultiver les anaérobies en grand, il est de toute nécessité de recourir à des appareils de plus vastes dimensions. En dehors des ballons déjà indiqués, on peut conseiller le *dispositif* suivant *dû à M. Würtz* (fig. 87) et qui sera varié facilement de différentes façons.



FIG. 87. — Appareil de Würtz.

Prendre un flacon d'un ou deux litres, à col un peu large et fermé par un bouchon de caoutchouc à deux trous. Dans ce bouchon passeront deux tubes de verre, dont l'un descendra jusqu'au fond du flacon, tandis que l'autre ne dépassera guère la face inférieure du bouchon. Tous deux sont coudés à leur émergence. Le premier se termine par une effilure, le second porte trois étranglements. Entre les deux premiers étranglements, on place un tampon de coton. Lorsqu'on veut se servir de l'appareil, on le

remplit de bouillon à moitié ou aux deux tiers et on le stérilise à l'autoclave. Quand il est stérilisé et refroidi, on lute le bouchon à la cire Golaz et on procède à l'ensemencement. Pour cela, on flambe le tube effilé ; on casse la pointe et on la plonge dans le liquide qui sert de semence ; on aspire par l'autre tubulure ; on ferme à la lampe. On fait le vide, on rince à l'hydrogène, on ferme au niveau du troisième étranglement, puis on porte à l'étuve. Quand on désire prélever un peu de la culture, on ouvre l'extrémité scellée ; l'air rentre dans l'appareil après s'être filtré sur la bourre de coton. L'effilure est flambée et brisée. On refoule la culture dans un vase stérile.

Lorsqu'on prépare de la toxine tétanique dans l'appareil de Wurtz, il est indiqué de ne pas faire descendre le tube de verre jusqu'au fond du flacon ; on pourra ainsi décanter simplement la culture au lieu de la filtrer, ce qui est parfois avantageux.

D) Il est très facile de cultiver les microbes anaérobies sur pommes de terre. On prend un *tube de Roux,* auquel on a soudé un peu au-dessous de l'étranglement un tube latéral étiré et muni d'un tampon de coton. On introduit la tranche de pomme de terre dans le tube ; on stérilise à l'autoclave ; on ensemence par strie puis on ferme à la lampe l'extrémité supérieure du tube. La tubulure latérale est reliée à l'appareil à vide. L'opération terminée, on ferme le tube latéral à la lampe.

E) Le *procédé* suivant, *indiqué par M. Roux*, permet de faire des cultures dans la gélatine ou la gélose. Il permet aussi de recourir séparément ou simultanément au vide et à l'hydrogène. On se sert de l'appareil que représente notre figure (fig. 88). C'est un tube à essai muni de deux tubulures, l'une supérieure, l'autre latérale. Toutes deux sont pourvues d'un tampon de coton. Supposons qu'on veuille faire une culture par

piqûre dans la gélatine. L'appareil est stérilisé à l'autoclave, après avoir été rempli jusqu'au quart inférieur avec le milieu nutritif. On ferme à la lampe la tubulure supérieure au-dessus du tampon de ouate. On liquéfie la gélatine, puis on fait le vide (suivi d'un rinçage à l'hydrogène) ou bien on fait simplement barboter de l'hydrogène. On coagule la gélatine par refroidissement. On flambe la tubulure supérieure ; on la coupe à l'aide d'un couteau à verre et on enlève le tampon de ouate. Le gaz s'échappe, empêchant l'introduction de l'air. Par l'orifice ainsi produit, on fait pénétrer un long fil de platine chargé de la semence qu'on désire cultiver et on ensemence par piqûre. On referme à la lampe la tubulure supérieure. Il ne reste plus qu'à sceller la tubulure latérale après avoir encore fait le vide ou rincé à l'hydrogène. On pourrait également ensemencer en stries sur gélatine inclinée. L'emploi de la gélose dans les manipulations précédentes nécessiterait un bain-marie réglé à 40° pour bien maintenir le milieu en fusion.



Fig. 88. — Tube de Roux.

4° Méthodes basées sur l'emploi de corps ou de microbes susceptibles d'absorber l'oxygène.

A) MM. Kitasato et Weill recommandent d'additionner les milieux (notamment les milieux solides)

de 0,3 à 0,5 pour 100 de formiate de soude. M. Salomonsen vante le sulfo-indigotate de soude (0,1 pour 100) dont nous avons déjà signalé l'avantage comme indicateur coloré. M. Liborius et M. Smith préfèrent simplement le glucose (2 pour 100). M. Veillon emploie de même la gélose additionnée de 1,5 pour 100 de glucose; il remplit le tube à essai de milieu nutritif sur une hauteur de 10 centimètres environ et ensemence avec une aiguille de platine très longue, de façon à porter la semence jusqu'au fond.



Fig. 89. Tube de Buchner.

L'addition de ces différents corps est insuffisante par elle-même pour amener le développement des anaérobies, mais elle permet la culture de ceux-ci dans les cas où l'oxygène n'a pas été strictement éliminé.

B) Un autre *procédé, dû à M. Buchner* (fig. 89), consiste à chasser, par l'ébullition, l'air d'un tube de bouillon stérile, à refroidir rapidement et à ensemencer avec le microbe qu'on désire étudier. Le tube est disposé dans un second tube plus grand, au fond duquel on a versé quelques centimètres cubes d'une solution alcaline d'acide pyrogallique :

Eau distillée.		10 grammes.
Acide pyrogallique.. .	} *àà*	1 —
Potasse caustique. . .	}	

Ce second tube est fermé à l'aide d'un bon bouchon qu'on scelle avec de la cire Golaz. L'oxygène restant diffus à travers le tampon du tube intérieur et arrive dans le tube extérieur où il est absorbé par l'acide

pyrogallique ; on en est averti par la teinte brune que prend le réactif réducteur.

C) Enfin, *M. Roux a montré qu'on pouvait mettre à profit*, pour cultiver les anaérobies, la *propriété d'absorber l'oxygène que possèdent certains microbes* strictement aérobies et donnant des voiles épais, le b. subtilis par exemple. Ce procédé peut être utilisé pour les cultures en milieux solides et même parfois en milieux liquides.

Porter à l'ébullition un tube de gélatine (ou de gélose), puis refroidir rapidement et ensemencer par piqûre. Plonger le tube dans l'eau froide et verser sur la gélatine un peu de gélose liquéfiée. Ensemencer à la surface une culture de b. subtilis. Ce microbe absorbera l'oxygène et l'anaérobie se développera parfaitement au-dessous. Quand on voudra faire la récolte, il faudra naturellement couper le tube avec le couteau à verre et le charbon Berzélius au niveau du cylindre de la gélatine. S'il ne devait pas être nécessaire d'obtenir une culture pure du microbe ensemencé, il y aurait avantage à s'adressèr aux milieux liquides. Le procédé, extrêmement simple, se prête très bien à l'obtention de certaines toxines, que la présence du b. subtilis ne modifie en aucune façon. M. Debrand a montré en effet que le b. tétanique, en présence du b. subtilis, élabore un poison aussi actif que lorsqu'il se trouve à l'état de pureté. Notons encore que le b.subtilis pourrait être remplacé, le cas échéant, par d'autres microbes avides d'oxygène, le b. mesentericus, par exemple.

Certains auteurs ont fait voir qu'on pouvait parfois cultiver les anaérobies au libre contact de l'air dans des milieux liquides très visqueux, tels que la gélatine à 15 pour 100 (mise à l'étuve à 37°). Le microbe commence à pousser au fond des tubes, puis il se développe peu à peu en hauteur.

III. *Méthodes de séparation et d'isolement.*

A) *Le procédé de Vignal* est simple et pratique (fig. 90). On prend un long tube de verre mince effilé à une extrémité, étranglé et muni d'un tampon de coton à l'autre. On le stérilise dans la flamme du chalumeau. On fait bouillir d'autre part (de façon à chasser l'air le plus complètement possible) un gros tube de gélatine qu'on additionne de quelques gouttes de teinture d'indigo stérilisée. Lorsque la gélatine est suffisamment refroidie, on l'ensemence et on l'aspire dans le tube, après avoir flambé et cassé l'extrémité effilée. Celle-ci est ensuite fermée ; on scelle également l'étranglement situé au bout opposé et on place



Fig. 90. — Tube de Vignal.

le tube sous un robinet d'eau froide, de manière à faire faire prise à la gélatine. Au bout de quelques jours, les colonies se montrent sous forme de fins nuages, au niveau desquels l'indigo se décolore ; des bulles de gaz apparaissent fréquemment, surtout si on a fait usage d'un milieu sucré. Lorsqu'on désire prélever une colonie, on sectionne le tube à une faible distance et on va la chercher à l'aide d'un fil de platine ou d'une effilure.

Il y a avantage à rincer le tube de Vignal avec l'hydrogène avant d'aspirer la gélatine. Inutile de dire que cette dernière peut être remplacée par la gélose.

B) *La boîte de Kitasato* (fig. 91) est moins employée. C'est un récipient aplati qui porte deux tubulures. L'une d'elles, plus volumineuse, est munie d'un étranglement et obturée à l'aide d'un tampon de

coton. L'autre, de diamètre inférieur, est effilée et peut être facilement fermée à la lampe. L'appareil

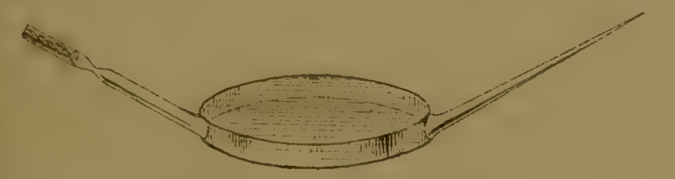


Fig. 91. — Boite de Kitasato.

étant stérilisé, on fait bouillir un tube de gélatine et on l'ensemence après refroidissement. On flambe et brise l'effilure et on aspire dans la boîte la gélatine ensemencée. On fait passer un courant d'hydrogène. Puis on ferme l'effilure, on scelle au niveau de l'étranglement et on fait faire prise à la gélatine. Les colonies se développent au bout de quelques jours. Les prélèvements sont assez difficiles à effectuer.



Fig. 92. — Tube de Fränkel.

C) *M. Fränkel se sert d'un fort tube à essai* fermé par un bouchon de caoutchouc dans lequel passent deux tubes coudés (fig. 92). L'un va jusqu'au fond du récipient, l'autre dépasse à peine la face inférieure du bouchon. L'un et l'autre sont, au niveau de leur partie extérieure, munis d'un étranglement et fermés à l'ouate. Le tout est entouré de papier et stérilisé à l'autoclave. On porte d'autre part à l'ébullition un tube de gélatine et on l'ensemence après refroidissement; puis on coule rapidement dans le tube de Fränkel. Le bouchon est solidement fixé au verre à l'aide de

la cire Golaz. On maintient la gélatine liquide, en immergeant le tube dans de l'eau tiède. On adapte à l'appareil à hydrogène la tubulure la plus longue et on fait barboter le gaz pendant 10 minutes. Les deux tubes extérieurs sont alors fermés au niveau de leurs étranglements. Le récipient est porté sous un robinet d'eau froide et on lui imprime un mouvement rapide de rotation, de façon à obtenir un revêtement régulier de la gélatine sur toute la surface du tube interne. Les prélèvements se font sans difficulté après avoir de soudé le tube, *M. Roux a simplifié cet appareil de la façon suivante* (fig. 93). Il se sert d'un tube à essai à l'extrémité supérieure duquel se trouve soudé un tube de verre de diamètre plus étroit. Ce dernier est muni d'un tampon de coton. On verse de la gélatine et on stérilise ; quand la gélatine est assez refroidie on ensemence. Puis on fait le vide en maintenant la gélatine liquide par immersion dans de l'eau tiède. Finalement, on ferme à la lampe et on enroule la gélatine, absolument comme pour un tube d'Esmarch ordinaire. Pour prélever les colonies, on sectionne le tube supérieur au-dessus du bouchon d'ouate et on introduit un fil de platine allongé par l'ouverture.



Fig. 93. Tube de Roux.

D) On pourra encore utiliser le *dispositif suivant dû* également *à M. Roux* et qui permet de chasser l'air à l'aide d'un simple courant d'hydrogène. Un tube de verre se continue à ses deux extrémités par deux autres tubes de diamètre moindre, qui bientôt se recourbent à angle droit (fig. 94). Les parties recourbées sont munies chacune d'un tampon de coton. Le tube central est rempli, à l'aide d'un entonnoir

stérilisé, de gélatine ensemencée qu'on maintient liquide par immersion dans de l'eau tiède. L'une des tubulures latérales est reliée à l'appareil à hydrogène. Le gaz, après avoir barboté dans le milieu, s'échappe par la tubulure opposée. Au bout d'une dizaine de minutes, on scelle à la lampe les deux tubulures, au niveau de leurs étranglements et on étale, sur la paroi intérieure du tube central, la gélatine qui bientôt fait prise. Lorsque les colonies se sont développées et qu'on désire les prélever, on sectionne le tube non loin d'elles et on les recueille au bout d'un fil de platine.

E) *Le procédé le plus simple* et le plus employé



Fig. 94. — Tube de Roux.

aujourd'hui *est celui de M. Veillon*, basé sur le principe des « couches élevées » de Liborius. M. Veillon se sert de tubes à essai de grande taille : 22 centimètres de long, sur 15 millimètres de diamètre. Chacun d'eux contient, sur une hauteur de 10 centimètres au moins, une gélose à 1,2 pour 100, très transparente, additionnée de 1,5 pour 100 de glucose. On fait fondre le milieu et on maintient à 100° pendant cinq à dix minutes (de manière à bien chasser l'air) un nombre de tubes proportionné à la richesse en germes du produit à examiner ; cinq à dix tubes suffisent généralement. Ils sont placés ensuite au

bain-marie à 40°. Un premier tube reçoit une goutte de semence, à l'aide d'une pipette stérilisée; on agite vivement et on transporte une petite quantité de gélose ensemencée dans un second tube; puis on répète la même manœuvre jusqu'à la fin de la série. L'ensemencement terminé, les tubes sont plongés dans l'eau froide et portés à l'étuve à 37°. La partie supérieure de la colonne de gélose dissout de l'air pendant le refroidissement; les microbes aérobies s'y développeront donc sans difficulté, tandis que les anaérobies occuperont les couches profondes. C'est à dessein que M. Veillon ne coule pas un bouchon de gélose à la partie supérieure de l'agar ensemencé; il se ménage ainsi une « zone de contrôle » très utile.

Les tubes de culture sont examinés tous les jours, non seulement à l'œil nu mais aussi à l'aide d'un très faible grossissement, car quelques espèces, donnant des colonies à peine visibles, pourraient passer inaperçues. Il faudra se rappeler que certains anaérobies poussent très lentement (au bout de 10 à 12 jours parfois). On prélève les colonies au moyen d'une pipette effilée et soigneusement flambée, qui joue le rôle d'emporte-pièce. Lorsque la colonie est très petite, il y a avantage à s'aider de l'aspiration; on adapte alors à la pipette un tube de caoutchouc souple, long de 40 centimètres environ, dont l'extrémité libre est reçue dans la bouche. Une fois la colonie recueillie elle est immédiatement repiquée (ou examinée au microscope, selon les cas). Le réensemencement se fait en soufflant légèrement le contenu de la pipette dans un tube préparé de la façon indiquée. Il est bon de laisser refroidir assez le tube pour que le réensemencement puisse avoir lieu au sein d'une gélose à demi prise : de cette manière la colonie ou la parcelle de colonie ne sera pas entraînée, par les courants dus aux différences de température, dans la région aérée du tube

où elle serait perdue (Guillemot). Notons encore que, s'il est des espèces qui poussent très lentement, d'autres se développent par contre très rapidement et meurent aussi très vite, tel le bacillus fragilis de Veillon et Zuber ; ces espèces demandent donc à être réensemencées sans retard, sinon elles sont perdues.

La méthode de Veillon n'offre que deux inconvénients : la production de gaz et d'acides. On remédie au premier par une dilution convenable de la semence et au second par des repiquages fréquents. Ces inconvénients légers sont insignifiants à côté des avantages évidents du procédé. Signalons enfin que, pour l'isolement des anaérobies par le procédé Veillon (ou par toute autre méthode), la gélatine se montre très inférieure à la gélose, car un grand nombre d'espèces pathogènes ne se développent qu'à une température supérieure à 24 degrés.

F) Nous nous bornerons à mentionner l'*isolement* proprement dit des anaérobies, dont il a été incidemment parlé au chapitre précédent et sur lequel on reviendra plus tard à propos du vibrion septique, du b. tétanique, etc...

CHAPITRE X

ÉLEVAGE ET NOURRITURE DES ANIMAUX. — MALADIES DES ANIMAUX DE LABORATOIRE

I. *Élevage et nourriture.*

L'achat des animaux grève fortement le budget des laboratoires. Dans beaucoup de villes, le prix d'un lapin est de 3 à 4 francs et l'on peut demander 1 fr. 50 ou 2 francs pour un cobaye et de 0 fr. 50 à 1 franc pour un rat blanc ou une souris blanche. On réalisera une économie notable en faisant reproduire ces animaux au laboratoire même. Il est donc bon de disposer d'une salle pour l'élevage. Chacune des femelles doit occuper, autant que possible, une cage isolée et on fait passer les mâles de l'une à l'autre. Quand une femelle a mis bas, il faut avoir soin d'écarter le mâle, qui souvent détruit la nichée; pour ne pas avoir à craindre le même inconvénient de la part de la femelle, on veillera à ce qu'elle ait à sa disposition une alimentation copieuse. Le fait est surtout important chez le lapin et le rat, qui mangent très facilement leurs petits. La durée de la gestation est en moyenne de 35 jours chez le lapin et de 65 chez le cobaye ; ces animaux fournissent facilement par an 3 à 4 portées. Le nombre des petits varie entre 2 et 6 chez le cobaye et le lapin ; il peut s'élever jusqu'à 10 et 12 chez le rat blanc et la souris blanche. Il va sans dire que la prophylaxie des maladies infectieuses sera, dans le local où a lieu l'élevage,

l'objet d'une sollicitude toute spéciale. On fera donc subir une quarantaine aux animaux neufs avant de les admettre. Chaque fois qu'un décès viendra à se produire, on pratiquera l'autopsie et on s'efforcera de déterminer la cause de la mort. Le corps sera brûlé et la cage désinfectée avec grand soin. Si les morts se multiplient, il ne faudra pas hésiter à évacuer le local temporairement et à ne le réoccuper qu'après qu'il aura été aéré pendant plusieurs jours et que toutes les cages auront été nettoyées puis désinfectées au moins à deux reprises.

La nourriture des animaux sera attentivement surveillée. Les chevaux ou les ânes recevront de l'orge ou de l'avoine et, en plus, du foin et de la paille. On donnera également du foin et de la paille aux bovidés et, s'il s'agit d'animaux à sérum, de l'orge concassé et du son. Les chèvres et les moutons recevront simplement du foin. L'été, on nourrit les cobayes et les lapins avec du fourrage vert (luzerne, trèfle, sainfoin) et, aussi, des choux, de la salade. L'hiver, on a recours aux betteraves, aux carottes, à des épluchures variées. En toute saison, on peut leur donner du son mouillé et, si on se trouve à proximité d'une brasserie, des résidus secs de fermentation (que l'on humectera avant de les distribuer). Ceux-ci constituent une nourriture excellente et très économique ; on pourrait tenter d'en donner également aux grands animaux (comme cela se fait dans certains pays), mais ils ne l'acceptent pas toujours volontiers, ainsi que nous l'avons observé. On a prétendu que l'eau occasionnait chez le lapin et le cobaye des diarrhées graves, sinon mortelles ; ces inconvénients paraissent avoir été très exagérés. Toutefois, il est inutile de donner à boire à ces animaux lorsqu'on les alimente de fourrages frais. Les souris et les rats sont fort peu diffi-

ciles au point de vue de l'alimentation : débris de cuisine, céréales, son, pain sec, tout leur convient ; ils doivent toujours avoir une écuelle d'eau à leur disposition.

II. *Maladies.*

Les animaux de laboratoire sont exposés à contracter de nombreuses maladies, les unes bénignes et facilement curables, d'autres très graves, susceptibles de se transmettre épidémiquement et de décimer en quelques jours toute une stalle. Ces maladies peuvent être également une source d'erreurs au cours des recherches bactériologiques. On doit donc bien les connaître et nous allons entrer à leur sujet dans quelques détails. Nous aurons surtout en vue ici les petits animaux.

1° Maladies des lapins.

Gale. — Les lapins sont très sujets à une gale spéciale. Elle débute par le conduit auditif externe ; le parasite peut ensuite gagner l'oreille moyenne et déterminer la mort au milieu d'accidents épileptiformes. L'aspect de l'oreille d'un lapin atteint de gale est tout à fait caractéristique ; le conduit auditif se trouve littéralement obstrué par des croûtes jaunâtres qui, examinées au microscope, montrent de nombreux acares. Il est donc bon de visiter périodiquement les oreilles des lapins. Dès qu'on a constaté la présence d'un cas de gale, il faut isoler l'animal malade, désinfecter sa cage et rechercher minutieusement les cas semblables. L'affection est très contagieuse et susceptible de causer de graves dégâts.

La gale du lapin est curable à condition d'être

traitée dès le début. Il suffit d'écouvillonner tous les jours, jusqu'à guérison complète, les oreilles de l'animal avec un tampon monté et imbibé d'une solution de crésyl à 2,5 pour 100. Le polysulfure de sodium à 5 pour 1000 donne également de bons résultats.

Coccidiose. — La coccidiose du lapin, bien étudiée par Leuckart, est due au coccidium oviforme. Elle fait périr un grand nombre d'animaux, surtout de jeunes sujets. Chez les adultes, elle revêt d'ordinaire une forme chronique, tandis que chez les jeunes elle prend souvent un caractère aigu.

A l'autopsie d'un lapin qui a succombé à la coccidiose chronique, on trouve le foie farci de masses blanchâtres ou jaunâtres, échelonnées le long des canaux biliaires et réalisant une sorte de pseudo-tuberculose de l'organe. A l'examen microscopique, ces masses se montrent constituées par un véritable amoncellement de parasites, qui ressemblent à des œufs de nématodes et ne prennent pas les matières colorantes. Ce sont des corps ovalaires, munis d'une double paroi ; tantôt le protoplasma remplit la totalité du parasite, tantôt il est contracté au centre.

Dans la coccidiose aiguë, on rencontre des lésions intestinales sous forme de plaques blanchâtres ; les cellules épithéliales renferment les sporozoaires à l'état de corps ovalaires ou falciformes. Cette dernière variété de parasites répond au soi-disant coccidium perforans de Schneider et Labbé. Il n'existe à la coccidiose du lapin aucun traitement curatif. On contribuera à empêcher l'extension de la maladie en brûlant les cadavres des animaux infectés.

Trypanosomes. — (Jolyet et de Nabias). Les lapins infectés par les trypanosomes maigrissent et meurent à la longue. Nous pensons qu'en présence de phénomènes cachectiques, se produisant chez des

animaux non inoculés, on fera bien d'examiner le sang au point de vue des trypanosomes. Il faut savoir toutefois que l'apparition et la disparition de ces parasites est des plus capricieuses.

Pasteurelloses et autres septicémies. — Les lapins sont exposés à un certain nombre de maladies septicémiques, décrites par M. Eberth et Mandry, Thoinot et Masselin, Lucet...,etc. La plupart de ces affections peuvent être rangées dans la classe des pasteurelloses (Lignières) dont on trouvera autre part les caractères bactériologiques. Pour M. Lignières, les lapins n'auraient pas de pasteurellose propre, et les pasteurella touvées dans les épidémies, qui parfois dévastent les clapiers, seraient tantôt du type ovin, tantôt du type porcin. Au point de vue clinique et anatomo-pathologique, la pasteurellose du lapin offre tantôt l'image d'une septicémie, tantôt celle d'une broncho-pneumonie. Dans ce dernier cas, le diagnostic ne peut être le plus souvent établi qu'en faisant des cultures avec le suc pulmonaire, car le bactérium pathogène ne se généralise pas. L'un de nous a constaté, en effet, à maintes reprises la stérilité du sang du cœur dans les formes broncho-pneumoniques.

Influenza. — L'« influenza » du lapin a été décrite très complètement par M. Kraus. Très contagieuse, elle est susceptible de causer de véritables désastres. Elle se caractérise, au point de vue clinique, par de la fièvre et surtout par un jetage séreux ou purulent. Bientôt le lapin maigrit et perd l'appétit. La mort survient au bout de quinze jours en moyenne, mais elle peut être beaucoup plus précoce (6 à 10 jours), comme aussi plus tardive (3 semaines). A l'autopsie, on trouve une rhinite purulente très intense et une inflammation du sinus maxillaire. Les lésions pulmonaires sont constantes. Elles se traduisent par une vive inflammation des bronches, souvent accompagnée

de splénisation pulmonaire et de pleurésie purulente.

L'agent pathogène est une bactérie mobile, qui ne se colore pas par la méthode de Gram et ne se rencontre que dans les lésions. Elle est aéro-anaérobie, mais surtout aérobie. Elle pousse sur tous les milieux usuels; elle ne liquéfie pas la gélatine et ne coagule pas le lait. Elle est inoculable au lapin, au cobaye et à la souris.

Chez le lapin, l'inoculation dans le nez reproduit l'affection naturelle. L'injection dans la trachée tue avec une bronchite purulente et une splénisation pulmonaire. L'inoculation dans le poumon donne de la splénisation, de la pleurésie et de la péricardite. On peut aussi injecter le virus sous la peau; la mort ne se produit alors qu'à la longue et les symptômes sont beaucoup moins caractéristiques. On n'arrive pas à reproduire la maladie chez le cobaye par inoculation intranasale, mais l'injection intratrachéale ou intrapulmonaire est suivie des mêmes lésions anatomo-pathologiques que chez le lapin. On tue rapidement l'animal par voie péritonéale. L'injection sous-cutanée fait périr lentement le cobaye comme le lapin. La souris est également inoculable par voie péritonéale (mort rapide) et sous-cutanée (mort lente).

Pseudo-tuberculose. — La pseudo-tuberculose du lapin est causée par le bacille de la tuberculose zoogléique de Malassez et Vignal, dont nous donnerons ailleurs les caractères bactériologiques. Elle a été étudiée par MM. Eberth, Charrin et Roger, Dor, Grancher et Ledoux-Lebard, etc. A l'autopsie d'un lapin qui a succombé à cette affection, on trouve le foie, la rate, l'intestin farcis de nodules allant du tubercule miliaire au tubercule caséeux. Les mêmes lésions se rencontrent chez le lapin inoculé par voie intraveineuse avec une culture un peu ancienne

l'inoculation intraveineuse d'une culture jeune amène au contraire la mort très rapidement.

2° Maladies des cobayes.

Trichomonas caviæ. — Cet infusoire flagellé donne lieu à des épidémies sévères (Galli-Valerio). A l'autopsie, on trouve l'intestin très congestionné avec de nombreux trichomonas à sa surface et dans son intérieur. L'affection est transmissible par ingestion de cobaye à cobaye. Elle n'est inoculable ni au lapin, ni à la souris.

Les cobayes sont parfois infectés par des trypanosomes (Künstler).

Septicémie des cobayes de Phisalix. — Cette forme de septicémie n'est pas très fréquente, mais elle a, comme nous le verrons, une grande importance. Elle est caractérisée, au point de vue clinique, par du larmoiement, du coryza, de la dyspnée, de la fièvre. Elle comporte un pronostic très grave. A l'autopsie, les lésions intéressent le poumon à l'exclusion des autres organes. Elles consistent en une congestion bilatérale très intense, souvent même en une véritable hépatisation. Dans les formes lentes, on peut trouver des épanchements des séreuses et particulièrement des plèvres.

L'affection est causée par un bactérium court, qui ne se colore pas par la méthode de Gram et qu'il est facile d'extraire du sang, des poumons ou du liquide épanché dans les séreuses. Il trouble légèrement le bouillon, où il dégage une odeur nauséabonde. Il donne sur gélose et sur sérum des cultures fort peu abondantes. Pas de développement sur pomme de terre. A la fois aérobie et anaérobie, le bacille de la septicémie des cobayes pousse bien dans le vide.

Il est inoculable à la plupart des animaux de laboratoire. Injecté sous la peau du cobaye, il le tue par

septicémie en 2 à 5 jours. Chez le lapin, la maladie est plus aiguë encore et la mort survient fréquemment en 24 heures. La souris est très sensible ; le pigeon un peu moins. Inoculé dans les veines du chien, le bacille donne lieu à une méningomyélite tout à fait spéciale. Dans ces derniers temps, M. Phisalix a montré l'identité de son bactérium avec la pasteurella de la maladie des chiens. On aura soin de tenir compte désormais de cette notion.

Pneumonie contagieuse. — M. Tartakowski a décrit chez le cobaye une pneumonie contagieuse différente de celle qui accompagne presque toujours la septicémie de Phisalix. Elle se traduit par de l'anorexie et de la faiblesse. Les poils de l'animal se hérissent et il est en proie à une vive dyspnée. Du jetage apparaît, tantôt jaune sale, tantôt rougeâtre, très concrescible. La mort survient dans la presque totalité des cas. A l'autopsie, on rencontre dans les plèvres un épanchement fibrineux ou fibrino-hémorragique souvent considérable. Les poumons présentent une hépatisation de teinte variée. Les ganglions bronchiques sont tuméfiés. La muqueuse nasale est rouge et recouverte d'un enduit filant et visqueux.

Très différente en cela de la septicémie des cobayes, la pneumonie contagieuse est due à un micro-organisme qui ne se rencontre pas dans le sang et ne peut-être isolé que des lésions pulmonaires et pleurales. C'est un bacille court, qui ne prend pas le Gram et pousse abondamment dans tous les milieux nutritifs. Il ne coagule pas le lait ; il ne liquéfie pas la gélatine ; il est strictement aérobie.

Le bacille de Tartakowski est inoculable au cobaye par la voie intranasale et intrapulmonaire. On reproduit alors une affection qui a les plus grandes analogies avec la maladie spontanée. L'inoculation dans le péritoine tue en 36 heures. L'injection sous-

cutanée donne lieu à des abcès et la mort survient au bout d'une quinzaine de jours. On peut également infecter le lapin, lequel ne prend pas la maladie spontanément.

Autres espèces de pneumonie. — M. Weber a observé à l'Institut hygiénique de Rostock une forme de pneumonie épidémique, caractérisée par un amaigrissement considérable, une dyspnée intense et une mort rapide. A l'autopsie, on trouvait dans le sang, le mucus nasal et surtout les poumons, un diplocoque immobile, sans capsules, ne liquéfiant pas la gélatine et poussant abondamment sur la pomme de terre. Il ne peut être identifié avec aucun micro-organisme connu.

M. Martini a observé de son côté, une pneumonie lobaire dont l'hépatisation est moins compacte que celle de la pneumonie classique. L'analyse bactériologique lui a permis d'isoler un microbe particulier, auquel il a donné le nom de bacillus pulmonum glutinosus. C'est un bâtonnet court, trapu, très mobile, parfois réuni en courtes chaînettes. Sur sérum sanguin, il donne des colonies en forme de gouttelettes fines et transparentes Il pousse péniblement en gélatine. Sur gélose, il produit une couche crémeuse d'une blancheur de lait. Il croît abondamment sur pomme de terre, où il forme un enduit épais, de couleur brun jaunâtre, ressemblant à du miel. Au bout de 8 à 15 jours la pomme de terre prend tout autour de la culture un aspect légèrement bleuâtre. Le bacillus pulmonum glutinosus ne forme pas de spores ; mais il est muni d'une capsule et de cils vitratiles. Il n'est pathogène ni pour le lapin, ni pour la souris. Inoculé au cobaye par inhalation, il entraîne la mort au milieu de symptômes identiques à ceux de la maladie spontanée. L'ingestion et l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale demeurent inoffensives.

Pseudo-tuberculose. — Le cobaye est beaucoup

plus réceptif que le lapin vis-à-vis du bacille de la tuberculose zoogléique. D'après M. Lignières, ce microbe peut donner lieu chez les cobayes à des épidémies susceptibles de tuer jusqu'à 90 pour 100 des animaux.

3° Maladies des rats.

Ce qui nous intéresse surtout chez le rat, c'est la fréquence d'un trypanosome spécial (fig. 95 et 96),



Fig. 95. — Trypanosome du rat (d'après Chalachnikow).

découvert par Gros et Chaussat, puis étudié par un grand nombre d'auteurs : MM. Evans, Danilewsky, Chalachnikow, Laveran et Mesnil, etc. La trypanosome du rat n'est transmissible à aucune autre espèce animale. Il ne se rencontre jamais chez les rats blancs ou tachetés et s'observe exclusivement chez les rats gris. La fréquence du trypanosome est fixée par Rabinowitch et Kempner à 41 pour 100. Le parasite est très bien supporté, mais il peut demeurer dans le sang pen-

dant des mois. On aura toujours cette cause d'erreur présente à l'esprit, lorsqu'on expérimentera sur les

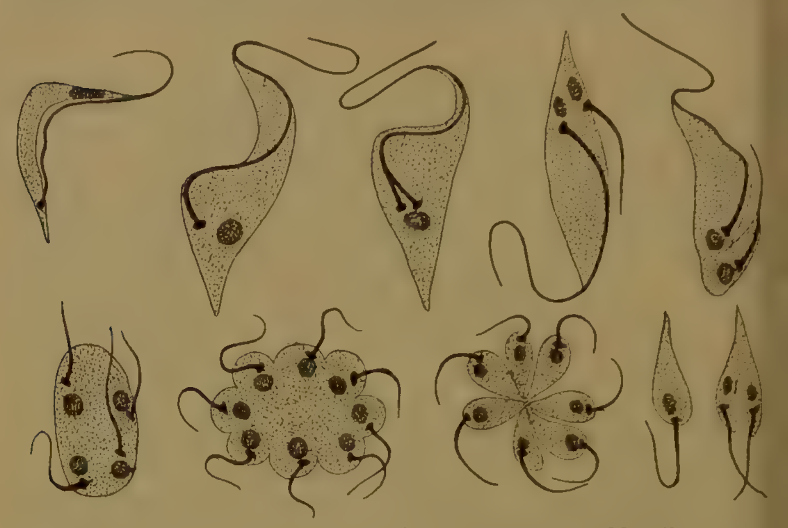


Fig. 96. — Trypanosome du rat (Laveran et Mesnil).
La comparaison des figures 95 et 96 permettra de se rendre compte des progrès accomplis dans l'étude morphologique des trypanosomes.

rats. Les rats blancs et tachetés seront, bien entendu, exclusivement employés dans les recherches concernant les trypanosomes.

4° Maladies des oiseaux de laboratoire.

Colibacilloses. — Les oiseaux sont exposés à contracter des maladies très nombreuse et très variées. Un certain nombre de ces affections sont dues à des colibacilles types ou à des variétés de colibacilles dont on trouvera ailleurs les caractères distinctifs. Dans ce groupe, rentre *la septicémie des poules et des dindes* décrite par MM. Lignières et Martel. Elle se traduit cliniquement par des phénomènes généraux et par de la diarrhée. A l'autopsie, on rencontre une hypertrophie considérable de la rate, une vive congestion

intestinale, quelquefois de la péricardite. La maladie est due à un colibacille typique. Inoculé dans le pectoral de la poule, il la fait succomber rapidement. Il tue également le lapin, soit qu'il ait été injecté dans une veine, soit qu'il ait été injecté dans la plèvre. Il épargne le pigeon.

La septicémie des pigeons de M. Sanfelice est due également au colibacille classique. Elle se révèle, au point de vue anatomo-pathologique, sous forme d'une péritonite pseudo-membraneuse, avec abcès des reins et inflammation violente de l'oviducte. Au point de vue bactériologique, on note dans toutes ces lésions la présence d'un colibacille très virulent, susceptible d'amener rapidement la mort du lapin, du cobaye et du pigeon.

Nous pouvons enfin ranger parmi les colibacilloses la *psittacose*, ou pneumonie infectieuse des perruches, sur laquelle nous reviendrons plus tard. La transmission possible de la psittacose à l'homme et la gravité du pronostic qui s'attache à cette forme de pneumonie doit faire surveiller d'une façon toute spéciale les psittacées qu'on pourrait avoir dans les laboratoires.

Pasteurelloses et autres septicémies. — Un groupe d'affections très fréquentes chez les oiseaux est constitué par les pasteurelloses. La plus répandue est le *choléra des poules*, si bien étudié par Pasteur, et susceptible de frapper les poules, pigeons, canards, oies, dindons, etc. Cette affection sera étudiée ultérieurement au point de vue bactériologique. Le choléra des poules n'est pas la seule pasteurellose qu'on puisse observer chez les oiseaux. Ceux-ci sont susceptibles en effet de s'infecter au contact d'animaux atteints d'autres pasteurelloses, de la pasteurellose des porcs par exemple (Lignières). En revanche, un certain nombre de septicémies décrites chez les oiseaux comme pasteurelloses n'en sont pas.

Parmi les septicémies aviaires il nous suffira de citer encore la maladie des poules décrite par M. Santori et due à une variété de prodigiosus.

Septicémie vibrionnienne. — M. Gamaleïa a décrit jadis, chez les poules d'Odessa, une maladie spéciale, caractérisée par de l'abattement, de la somnolence et de la diarrhée. A l'autopsie, la muqueuse intestinale présente une congestion très marquée. L'intestin grêle est rempli d'un liquide gris jaunâtre, dans lequel l'examen microscopique décèle la présence de nombreux vibrions (v. Metchnikowii), très semblables à ceux du choléra. Ces vibrions, sur lesquels nous reviendrons plus tard, sont inoculables par ingestion aux jeunes poulets, auxquels ils donnent une affection identique à la maladie naturelle. Ils sont inoculables par voie sous-cutanée à la poule adulte, au pigeon et au cobaye, qu'ils tuent également par septicémie.

Diphtérie. — Elle est fréquente chez les oiseaux, particulièrement chez les poules et les dindons. Elle débute d'ordinaire par du coryza ; puis des fausses membranes, très analogues à celles de la diphtérie humaine, apparaissent dans la trachée, le pharynx, les fosses nasales et souvent à la surface des conjonctives. Qu'elle soit due au b. de Löffler (Ferré, Creignon) ou qu'elle soit causée par l'un des nombreux micro-organismes qui ont été décrits par MM. Babès, Loir et Ducloux, et Löffler lui-même, elle se montre épidémique et contagieuse. Certains faits sont de nature à laisser supposer qu'elle est transmissible à l'homme et il importe de prendre contre elle de sévères mesures prophylactiques. Le meilleur traitement à lui opposer, d'après Ferré, serait l'injection du sérum antidiphtéritique.

Il nous suffira de mentionner *la spirillose des oies* de Sakharoff, et la présence possible, dans le sang des oiseaux, de *trypanosomes* ou d'*hématozoaires*. Ces

affections nous intéressent surtout par l'erreur qu'elles pourraient entraîner au cours des inoculations expérimentales. Rappelons enfin l'existence assez fréquente chez la poule de la *tuberculose aviaire* et l'existence moins fréquente de la *tuberculose zoogléique*.

5° Maladies des bovidés.

Il nous suffira de citer la *fièvre aphteuse*, extrêmement contagieuse et qu'il faut éviter à tout prix ; et *la péripneumonie*, très fréquente dans certaines régions. La *septicémie des veaux* est causée par un microbe qui offre les plus grandes analogies avec le b. d'Eberth (Thomassen). *La diarrhée infectieuse* de ces mêmes animaux est due à un colibacille (Jensen). Nous reviendrons plus tard sur ces diverses affections. Il faut redouter au plus haut point la *tuberculose*. Lorsqu'on achète des animaux, on aura toujours soin de les éprouver à la tuberculine, avant de les mêler aux sujets sains.

On a décrit, chez les bovidés, *des pseudo-tuberculoses variées*, quelques-unes susceptibles de se transmettre épidémiquement. Signalons enfin la fréquence du *piroplasma bigeminum*. Ce parasite s'observe dans le monde entier et M. Lignières a récemment signalé sa présence chez les bovidés du Nord de la France. Le réveil de l'hématozoaire, sous l'influence des inoculations du virus de la peste bovine, a été mentionné par l'un de nous en collaboration avec le vétérinaire Adil-bey. Il y a là, au cours des expériences, une cause d'erreur qu'il est important de connaître.

6° Maladies des équidés.

La morve est grandement à redouter chez le cheval. D'où la nécessité de n'employer, surtout pour la

sérothérapie que des animaux dûment éprouvés à la malléine et réinoculés ensuite tous les deux mois (Nocard).

Citons encore, parmi les maladies des équidés, la *gourme,* qui frappe surtout les jeunes chevaux et dont nous aurons à nous occuper ultérieurement.

Les solipèdes sont sujets à des *trycophyties* variées, de pronostic bénin, mais qu'il importe de soigner. On savonnera une ou deux fois par jour les régions malades au savon vert, ou au savon de crésyl à 10 pour 100. Dans l'intervalle des savonnages, on appliquera sur les lésions de l'huile de cade, mélangée à des doses croissantes d'essence de térébenthine, jusqu'à ce que l'animal supporte l'essence pure. Au début de la maladie, l'application, trois jours de suite, de teinture d'iode est parfois suffisante. Ce traitement convient également aux tricophyties des bovidés, très fréquentes dans certains pays.

7° Maladies des singes.

On redoutera surtout chez eux la *tuberculose.* Aussi évitera-t-on avec le plus grand soin de les mettre dans des endroits infectés ou de les laisser en contact avec des sujets tuberculeux. Lorsqu'on a soin d'acheter les singes aussitôt après leur arrivée en Europe et de les soustraire aux contaminations accidentelles, il est fort aisé de prévenir chez eux l'éclosion de la tuberculose, ainsi que nous l'avons dûment observé pendant des années.

CHAPITRE XI

INOCULATIONS EXPÉRIMENTALES
PRÉLÈVEMENT DES PRODUITS IN VIVO

Le but qu'on se propose en pratiquant une inoculation est loin d'être toujours identique. Quelquefois on veut simplement savoir si une espèce microbienne est, ou non, pathogène pour un ou plusieurs animaux donnés. D'autres fois, ayant isolé un micro-organisme d'une maladie ou d'une lésion, on cherche à reproduire chez l'animal cette maladie ou cette lésion. C'est la preuve expérimentale, qu'on doit toujours s'efforcer de faire quand on découvre un microbe. Une fois réalisée, elle constitue un véritable criterium diagnostique. L'inoculation expérimentale représente parfois un procédé de séparation ou d'isolement. Ce peut être aussi un mode de vaccination : on cherche à conférer à un animal la maladie atténuée, qui le préservera des atteintes de la maladie grave, C'est aussi un moyen de renforcement des virus. On connaît en effet l'importance des « passages » d'animal à animal pour augmenter l'énergie pathogène des microbes. Plus rarement enfin, l'inoculation expérimentale réalise au contraire un procédé d'atténuation (Pasteur). Ces quelques considérations nous expliquent l'importance majeure des inoculations en bactériologie. Leur étude comporte celle :

des instruments destinés à les pratiquer,

de la préparation du produit à inoculer,

du choix de l'animal,

des divers modes d'inoculation,

des procédés de contention et d'anesthésie,

des moyens de triompher de la résistance de certains animaux,

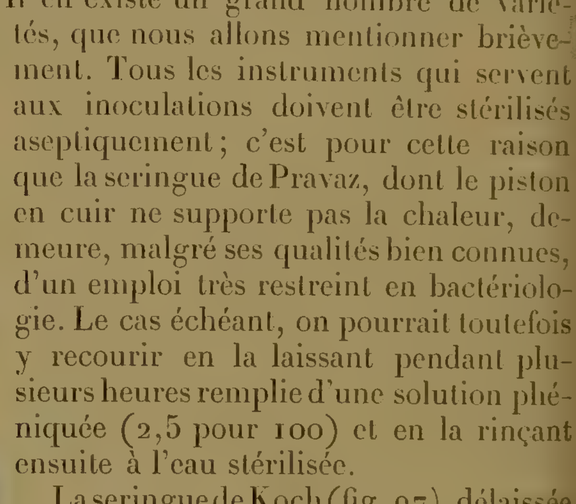
des soins à donner après l'inoculation.

Nous passerons successivement ces différents points en revue, puis nous dirons un mot des maladies expérimentalement transmises à l'homme et du prélèvement des produits pathologiques in vivo.

1° *Instruments et objets nécessaires pour les inoculations.*



Fig. 97. — Seringue de Koch.



A) **Seringues.** — L'instrument le plus employé est la seringue. Il en existe un grand nombre de variétés, que nous allons mentionner brièvement. Tous les instruments qui servent aux inoculations doivent être stérilisés aseptiquement ; c'est pour cette raison que la seringue de Pravaz, dont le piston en cuir ne supporte pas la chaleur, demeure, malgré ses qualités bien connues, d'un emploi très restreint en bactériologie. Le cas échéant, on pourrait toutefois y recourir en la laissant pendant plusieurs heures remplie d'une solution phéniquée (2,5 pour 100) et en la rinçant ensuite à l'eau stérilisée.

La seringue de Koch (fig. 97), délaissée aujourd'hui, représente un cylindre de verre gradué, dont le contenu peut être exprimé à l'aide d'une poire de caoutchouc. Cette poire s'altère rapidement ; de plus, elle est insuffisante à faire pénétrer les liquides dans des tissus à mailles un peu serrées. Enfin l'appa-

reil est bien moins facile à manier que les seringues à piston, exclusivement employées à l'heure actuelle.

Un bon modèle de seringue à piston est celui de Strauss-Collin. Il comprend : 1° un corps de pompe en verre, reposant sur deux rondelles de caoutchouc ; 2° une monture métallique ajourée qui reçoit le corps de pompe ; sa partie inférieure porte un petit tube qui sert de point d'insertion aux aiguilles ; sa partie supérieure, susceptible de se dévisser, présente un trou par lequel passe la tige du piston ; 3° un piston, en moelle de sureau, stérilisable par la chaleur et susceptible d'être improvisé facilement par l'expérimentateur lui-même ; 4° une petite tige de serrage, terminée en bas par un disque plein en tête de clou et en haut par un pas de vis ; le piston, traversé par cette tige, vient butter en bas contre le disque ; 5° une grosse tige, tige du piston proprement dite, à l'intérieur de laquelle est cachée la tige de serrage ; elle se termine en bas par un disque perforé ; en haut elle finit librement, dépassée par la tige de serrage ; cette grosse tige porte une graduation et un curseur ; 6° un bouton conique dont le sommet s'articule avec le pas de vis supérieur de la tige de serrage ; en vissant plus ou moins on écrase plus ou moins le piston qui s'oppose ainsi au reflux des liquides aspirés. Dans les grands modèles, on remplace la moelle de sureau par celle de ferdinanda, plus volumineuse. Au lieu de ces moelles on peut faire usage de rondelles d'amiante, que nous ne saurions trop recommander.

M. Roux a fait construire par Collin plusieurs types de seringues ; nous ne citerons que les deux principaux. L'un offre un corps de pompe tout en verre (excellent mais fragile) et un piston en moelle de sureau. L'autre, destiné aux inoculations sérothérapiques, possède un piston-parachute en caoutchouc, composé de deux rondelles séparées par un anneau métallique.

Il existe plusieurs dimensions de ces seringues. Le modèle courant (fig 98) possède une capacité de 20 centimètres cubes. L'aiguille est réunie au corps de l'instrument par un tube de caoutchouc long de 10 centimètres. L'injection peut ainsi être poussée sans déplacer l'aiguille.

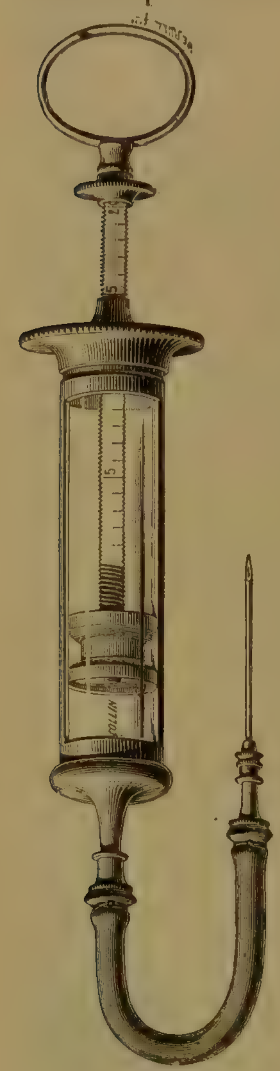


Fig. 98. — Seringue de Roux.

Il existe encore un grand nombre d'autres seringues (Debove, (fig. 99), Félizet, etc.)... Certaines ont des pistons métalliques, d'autres sont tout en verre, etc.

Il est aisé d'improviser soi-même des pistons stérilisables pour divers modèles de seringues. On prend par exemple une seringue de Pravaz ordinaire ; on enlève le cuir et on le remplace par un petit tube de caoutchouc entrant facilement dans le cylindre. On passe ce caoutchouc dans le talc pour qu'il glisse mieux ; on l'attache solidement à la tige métallique et on obtient ainsi un piston qui tient fort bien.

L'un de nous a fait construire, par M. Simal, une seringue à corps de pompe entièrement métallique dont l'emploi s'est généralisé en Turquie pour la sérothérapie antidiphtérique. L'opacité de l'instrument n'offre aucun inconvénient sérieux, elle est largement compensée par l'absence de fragilité.

Il est bon de posséder (en dehors de la seringue à sérum) des modèles de 10, 5 et 1 ou 2 centimètres cubes. La seringue de 5 centimètres cubes est absolument indispensable.

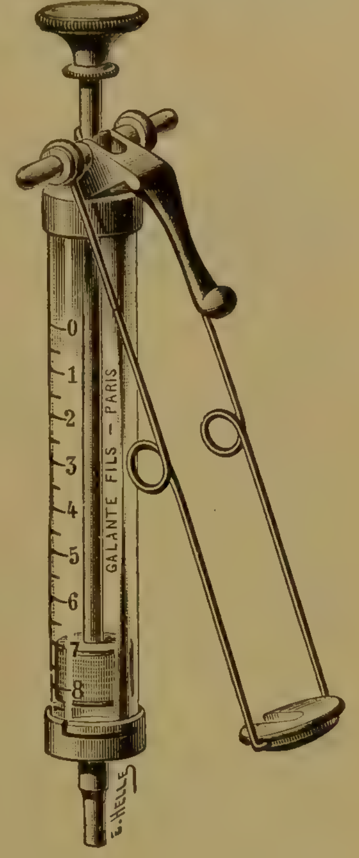


Fig. 99. — Seringue de Debove.

Quel que soit le modèle choisi, on peut y adapter soit des aiguilles d'acier, soit des aiguilles de platine iridié. Ces dernières ont une qualité, celle d'être inaltérables à l'humidité et à la chaleur et un défaut, celui de manquer de rigidité. Les aiguilles d'acier seront toujours suffisantes, si on a soin de les faire sécher rapidement quand elles sortent de l'eau, de les conserver dans le borax, et de ne pas les détremper en les chauffant à la flamme.

Il est très important de posséder des aiguilles de différentes longueurs et de différents calibres ; les aiguilles courbes sont également susceptibles de rendre parfois des services.

Si l'on n'avait pas de seringue à sa disposition, on tâcherait d'y suppléer à l'aide d'une simple pipette. Cette pipette, suivant la résistance des tissus à traverser, sera introduite telle quelle ou bien après ponction ou cautérisation des téguments. On pourra lui adapter l'aiguille de la seringue de Pravaz ; enfin on soufflera au besoin avec une poire de caoutchouc.

B) **Injecteurs.** — On est parfois obligé, dans l'immunisation par les toxines en particulier, d'injecter de grandes quantités de liquides et les seringues se trouvent alors insuffisantes. On se servira dans ces cas de l'injecteur de Chabaud ou d'une simple pissette dont le tube court est fermé par un tampon de ouate et le tube long relié à un caoutchouc. Au caoutchouc s'adapte une forte aiguille ou un ajutage susceptible de s'articuler avec une aiguille à baïonnette.

On emploie aussi, dans certains cas, l'appareil inventé par MM. Roux et Chamberland pour vacciner les lapins contre le charbon par la voie intraveineuse. Cet appareil consiste dans un gros tube gradué, à goulot effilé, qui contient un tube plus mince. Ce second tube commence un peu au-dessus du fond, s'élève le long de l'axe, et, après s'être coudé près de la partie supérieure, traverse la paroi et se prolonge au dehors. Il s'adapte au caoutchouc muni de l'aiguille. On souffle par le goulot, garni d'un tampon de coton.

Pour actionner les gros injecteurs nous recommandons une pompe à main nickelée, pour les petits la poire classique de Richardson.

C) **Autres instruments ou objets.** — En dehors des seringues, nous nous contenterons de rappeler les ciseaux, les pinces à dissection et à forcipressure, les scalpels, les écarteurs, les aiguilles à suture, etc..., etc... Des instruments spéciaux, tels que le trépan, sont parfois nécessaires. Tous ces instruments peuvent être stérilisés soit à l'autoclave, soit, plus simplement, par ébullition dans une casserole remplie d'une solution de borax à 4 pour 100, qui empêche l'oxydation. La stérilisation des seringues demande quelques précautions. Il faut les isoler du fond de la casserole, en les disposant dans le petit panier que représente notre figure (fig. 100), ou

encore, en les soulevant à l'aide de petites tiges de verre. Ces précautions sont inutiles quand on se sert de boîtes spéciales en tôle émaillée qui présentent un fond mobile perforé. Il ne faut jamais, bien entendu, introduire une seringue dans de l'eau déjà très chaude.

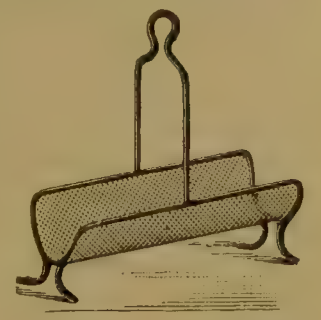


Fig. 100. — Panier métallique pour faire bouillir les seringues.

On aura enfin à sa disposition :

1° Du papier de soie stérilisé ; on fait de petites boulettes, qu'on met dans un bocal au fond duquel on a versé un peu d'eau. On ferme avec un capuchon de papier et on stérilise à l'autoclave.

2° Du fil stérilisé. Il est bon d'en posséder une provision ; à cet effet, on met une bobine de fil dans un flacon ; on verse quelques gouttes d'eau ; on bouche avec un bouchon de liège percé d'un trou pour laisser passer l'extrémité du fil et on stérilise à l'autoclave. Chaque fois qu'on a besoin de fil, on en attire au dehors une certaine longueur avec une pince flambée. On brûle les premiers centimètres qui dépassaient le flacon et ont, par conséquent, de grandes chances d'avoir été souillés. Nous devons faire observer toutefois que, le plus souvent, on stérilise le fil par ébullition en même temps que les aiguilles à suture.

3° De l'eau stérilisée, dans un matras pipette. On se sert fréquemment aussi de bouillon stérilisé ou de la solution physiologique de chlorure de sodium (0,75 pour 100).

4° Des verres flambés, des agitateurs, des pipettes Pasteur, etc. (voir chapitre I).

5° Diverses solutions antiseptiques, usitées pour la désinfection de la peau et des poils. Le sublimé

présente, surtout lorsqu'il a été acidifié, l'inconvénient de ne pas bien mouiller la peau et les poils. Le crésyl les mouille au contraire fort bien (2,5 pour 100). Il en est de même de l'eau saturée de tricrésol (Schering). Pour des raisons analogues, le coton ordinaire, trempé dans la solution de crésyl ou de tricrésol, s'imbibe absolument comme du coton hydrophile. L'inoculation terminée, on doit désinfecter avec grand soin, à l'eau bouillante ou à la vapeur sous pression, tout le matériel qui a servi pour l'opération. Nous le disons ici une fois pour toutes.

2° *Préparation de la matière à inoculer.*

Les inoculations courantes se pratiquent, ainsi que nous le verrons plus loin, soit par insertion, soit par injection. On recourt beaucoup plus rarement à l'ingestion ou à l'inhalation.

Dans le premier cas, on n'a à faire aucune opération préliminaire ; il suffit de prélever la matière à inoculer, soit avec un fil de platine s'il s'agit d'une culture sur milieu solide, soit avec des instruments flambés, s'il s'agit d'un fragment de tissu et de la transporter sous la peau dans le péritoine etc., comme il sera indiqué plus loin. L'inoculation par insertion, très employée autrefois, présente l'inconvénient de renseigner fort mal sur la quantité de virus que l'on administre. On lui préfère de beaucoup le procédé par injection. Il est alors nécessaire de remplir la seringue (préalablement stérilisée) avec le liquide à injecter et la façon de préparer celui-ci varie un peu suivant la nature du produit qu'on inocule.

Si l'on a affaire à une culture liquide, on en aspirera la quantité nécessaire à l'aide d'une pipette stérilisée et on la versera dans un verre flambé. Dans le cas d'une culture sur milieu solide, il est

indispensable de pratiquer une dilution. A cet effet, on commencera par verser dans le verre une certaine quantité d'eau physiologique ou de bouillon stérilisés. Puis on prélèvera la masse voulue de culture avec un fil de platine et on la délayera sur la paroi du verre, de manière à la mélanger peu à peu au liquide. On flambera ensuite le fil de platine. Certaines cultures possèdent une consistance très dure (tuberculose humaine par exemple) qui rend leur émulsion difficile. Il est indiqué de les broyer avec un agitateur flambé soit dans le tube à culture lui-même, soit dans un verre, en ajoutant par petites portions le liquide qui sert à les délayer. Il va sans dire qu'avant d'inoculer une culture, il faut toujours l'examiner au microscope afin de s'assurer de sa pureté.

Si le sang et le pus viennent d'être recueillis, on pourra les inoculer tels quels (pour le sang il faut opérer rapidement, sinon il se coagule). On peut aussi les délayer dans de l'eau physiologique ou du bouillon stérilisés.

Toutes les fois qu'on n'aura pas de raisons spéciales pour inoculer les pulpes d'organes par insertion, il sera bien plus commode de les injecter après émulsion. On les écrasera au fond d'un verre avec un agitateur comme il a été dit plus haut, puis on passera à travers une mousseline, ou bien on remettra le capuchon de papier qui recouvre le verre et on attendra un instant pour laisser déposer les particules les plus volumineuses qui boucheraient l'aiguille de la seringue.

Même dans le cas de tissus de consistance dure (lésions cutanées diverses, nodules fibreux de la tuberculose, de la morve, etc.), il est préférable de faire l'inoculation par injection plutôt que par insertion. On divise les tissus en petits fragments, puis on les broie dans un mortier avec du sable fin ; on filtre sur mousseline et on

injecte le liquide filtré. Il va de soi que le mortier, le sable, l'entonnoir et l'étoffe auront été stérilisés à l'autoclave ou tout au moins à 100°.

Chaque fois qu'on a aspiré un produit quelconque, il faut purger la seringue d'air. Pour cela, on prend le capuchon de papier qui recouvre le verre à expérience ; on le retourne et on le traverse de bas en haut avec l'aiguille. On presse sur le piston pour chasser l'air. Si un peu de liquide virulent s'échappe, il retombe sur le papier. Si même un petit jet se produit, il va frapper les bords du capuchon renversé qui l'absorbent.

3° *Choix de l'animal.*

Pour pouvoir être classé dans le groupe des « animaux de laboratoire », un animal remplira de toute nécessité les conditions suivantes. Il devra :

1° Être réceptif au plus grand nombre possible de microbes pathogènes.

2° Être de mœurs douces, commode à manier et à contenir.

3° Être facile à trouver et d'un prix de revient peu élevé.

Les animaux qui remplissent le mieux ces conditions appartiennent pour la plupart à la classe des rongeurs. Ce sont, avant tout, les cobayes, les lapins, les souris blanches, les rats blancs. Nous citerons ensuite la souris grise ; le rat gris et le chat, difficiles l'un et l'autre à manier ; le chien moins difficile à manier, mais réfractaire à un grand nombre d'affections. La poule et le pigeon sont assez souvent employés, les petits oiseaux (moineau, calfat) plus rarement. Avec les animaux d'une taille et d'un prix plus élevés, le mouton, la chèvre, les bovidés, l'âne, le cheval, nous sortons des animaux de laboratoire proprement dits.

Les animaux à sang froid ne servent qu'exceptionnellement. Enfin les singes seraient d'un usage courant, n'étaient leur prix élevé et leur constitution délicate.

Il importe d'avoir toujours bien présent à l'esprit le degré de susceptibilité des différentes espèces animales vis-à-vis des micro-organismes que l'on étudie. Le tableau suivant donne, pour chacun des principaux virus, le nom des animaux de choix, la liste des animaux plus ou moins réceptifs et enfin celle des espèces tout à fait réfractaires. Il va de soi que si, au lieu d'un microbe bien déterminé, on étudie un microbe nouveau, dont on désire connaître les aptitudes pathogènes, il y a intérêt à l'inoculer au plus grand nombre possible d'espèces animales.

Nota. — Dans la liste suivante, lorsqu'on mentionne uniquement l'inoculation sous-cutanée, cela veut dire qu'elle suffit d'ordinaire soit pour tuer, soit pour produre des lésions ou symptômes caractéristiques.

DEGRÉ DE RÉCEPTIVITÉ DES ANIMAUX AUX DIFFÉRENTS VIRUS

NOM DES MICROBES	ANIMAUX DE CHOIX	ANIMAUX PLUS OU MOINS RÉCEPTIFS	ANIMAUX RÉFRACTAIRES	OBSERVATIONS
Bactéridie charbonneuse.	Souris, cobaye (sous la peau).	Lapin, moutons (la plupart des races), chèvre, rat blanc, porc, bovidés, solipèdes, hippocampe.	Chien, poulet, pigeon, moutons algériens.	L'état réfractaire de ces derniers animaux n'est pas absolu. — Virus dangereux à manier.
Bactérie du choléra des poules.	Poule, pigeon, lapin, petits oiseaux, souris, spermophile, (sous la peau ou dans les muscles).	Cobaye. Grands animaux, carnassiers.	»	Les grands animaux et les carnassiers sont peu sensibles, mais on les tue avec un virus très virulent.
Bactérie de la pasteurellose équine.	Cobaye, lapin, souris (sous la peau).	Bœuf, rat, porc (résiste à l'inoculation sous-cutanée).	Chien, chat, poule, pigeon, mouton, âne, cheval.	Le bœuf et le rat sont vraiment réfractaires.
Bactérie de la pasteurellose bovine; bactérie de la pasteurellose ovine.	(Virulence des plus variables.)			
Bactérie de la pasteurellose porcine.	Souris, lapin, porc (sous la peau).	Rat blanc, cobaye, poule, pigeon.	Grands animaux (autres que les porcs) très résistants, carnassiers très résistants également.	»
Bacille du Hog-choléra [illegible]	Souris, rat blanc, cobaye, lapin, [illegible]	Moutons, veau (si on [illegible]	Poule, chien, cheval.	»

	(sous la peau ou dans les muscles).		animaux autres que le porc.	l'infection du porc est souvent difficile à réaliser.
Staphylocoque.	Souris (sous la peau) si le microbe est assez virulent.	Lapin, cobaye.	»	»
Tétragène.	Cobaye, souris (l'inoculation dans le péritoine est plus sûre que l'inoculation sous-cutanée).	Lapin.	»	»
Gonocoque.	Homme (inoculation dans l'urètre), jeunes cobayes (dans le péritoine), lapins nouveau-nés (sac conjonctival).	»	Tous les animaux (excepté le cobaye et le lapin, très jeunes et inoculés comme il a été dit).	»
Méningocoque.	[Il existe suivant les auteurs de grandes divergences. On a donné par trépanation une méningite à la chèvre. Des doses de culture énormes, injectées dans le péritoine, parviennent à tuer le cobaye (par intoxication). L'inoculation dans les séreuses amène assez souvent la mort de la souris.]			
Strepto-bacille du chancre mou.	Singe (scarifications).	»	»	Inoculation courante chez l'homme dans un but diagnostique.
Streptocoque pyogène.	Lapin, souris (sous la peau si le microbe est assez virulent), homme (érysipèle).	Cobaye, chien (grands animaux si le virus est très virulent).	Oiseaux.	»
Streptocoque de la mammite contagieuse des vaches.	Vache, chèvre (l'inoculation dans les canaux galactophores reproduit la maladie).	»	Chien, cobaye, lapin.	»

NOM DES MICROBES	ANIMAUX DE CHOIX	ANIMAUX PLUS OU MOINS RÉCEPTIFS	ANIMAUX RÉFRACTAIRES	OBSERVATIONS
Streptocoque de la gourme.	Cheval (inoculation sur la pituitaire), souris (sous la peau).	Lapin, cobaye.	Mouton, chien, porc, pigeon.	»
Micrococque de la mammite gangreneuse des brebis laitières.	Brebis (injection dans les canaux galactophores).	Lapin.	Grands animaux (sauf la brebis) carnivores, oiseaux.	»
Bacille de la morve.	Cheval, âne (scarification), cobaye mâle (vaginalite si on inocule dans le péritoine), chien (scarification), chat, spermophile (sous la peau).	Souris, lapin.	Le mouton, la chèvre, le porc, sont quasi-insensibles. Les oiseaux, les bovidés sont complètement réfractaires.	Virus dangereux à manier.
Bacille de la lymphangite pseudo-farcineuse de Nocard et de la broncho-pneumonie caséeuse du mouton (bacille de Preisz-Nocard).	Souris, mouton (sous la peau); on peut reproduire la lymphangite chez le cheval, mais difficilement.	Cobaye (vaginalite et orchite par inoculation intrapéritonéale), lapin, pigeon.	Poule.	»
Bacille pyocyanique.	Cobaye, lapin, rat, souris (sous la peau).	»	Oiseaux.	»
Bacille tuberculeux humain.	Cobaye (sous la peau).	Lapin, chien, bovidés, perroquet, etc.	Poule, pigeon.	Virus très dangereux quand on pratique [illegible]

aviaire.	peau).			
Bacille tuberculeux pisciaire.	Divers animaux à sangfroid.	»	Animaux à sang chaud.	
Bactérium de la pseudo-tuberculose de Malassez et Vignal.	Cobaye, lapin (sous la peau).	Souris.	»	»
Actinomyces. . . .	Cobaye et lapin dans le péritoine (?).	»	»	Les tentatives d'inoculation de l'actinomycose échouent presque toujours.
Streptothrix du farcin du bœuf.	Cobaye, mouton, vache (sous la peau).	»	Lapin, chien, chat, cheval.	»
Streptothrix d'Eppinger.	Cobaye, lapin (sous la peau).	»	»	»
Bacille de la peste bubonique.	Souris, cobaye, rat, lapin, singe (sous la peau).	Cheval, pigeon.	Carnassiers, grands animaux (sauf le cheval), poule.	Virus très dangereux à manier.
Vibrion septique.	Cobaye, lapin, rat blanc, solipèdes, mouton, chèvre (dans les muscles).	Rat d'égout, porc, chien, chat, oiseaux.	Bovidés.	Les bovidés peuvent s'infecter dans certaines conditions.
Bacille du charbon symptomatique.	Cobaye, mouton, bovidés (dans les muscles).	Lapin.	Porc, chien, chat, rat, poule, pigeon, cheval.	On obtient chez le cheval une tuméfaction transitoire.

NOM DES MICROBES	ANIMAUX DE CHOIX	ANIMAUX PLUS OU MOINS RÉCEPTIFS	ANIMAUX RÉFRACTAIRES	OBSERVATIONS
Bacille tétanique. .	Souris, rat blanc, cobaye (sous la peau).	Lapin, chien.	Oiseaux.	Virus dangereux à manier.
Vibrion cholérique..	Cobaye, lapin, souris, spermophile, chien, chat (modes divers d'inoculation).	Pigeon.	»	On peut reproduire le choléra vrai chez les jeunes rongeurs et les jeunes carnassiers. On sait que la maladie a été reproduite également chez l'homme.
Bacille typhique. .	Cobaye, souris, lapins, rat, singe (modes divers d'inoculation).	»	»	On a réalisé la fièvre typhoïde expérimentale du lapin, du rat, du singe.
Colibacille. . . .	Cobaye, lapin (dans le péritoine), souris (sous la peau).	»	»	»
Bacille de la psittacose.	Perroquet, souris, pigeon, poule (sous la peau).	Lapin, cobaye.	»	»
Pneumocoque. . .	Souris, lapin (sous la peau).	Cobaye, chien, mouton, rat.	Oiseaux.	»
Bacilles encapsulés..	Souris (sous la peau).	Cobaye, lapin, pigeon	»	»
Bacille de Pfeiffer. .	Jeunes cobayes (dans le péri-	»	»	»

	(sous la peau).			chez l'homme.
Spirille des oies (Sakharoff).	Oies, canards, poules (surtout jeunes poulets) (sous la peau).	»	»	»
Microcoque de la fièvre de Malte.	Singe (sous la peau).	»	»	»
Bacille diphtérique..	Cobaye, pigeon (sous la peau).	Lapin, chien, grands animaux.	Rat, souris.	»
Oidium albicans. .	Lapin (dans les veines).	Cobaye, chien.	»	»
Aspergillus fumigatus.	Pigeon, lapin, singe (dans les veines).	»	»	»
Trypanosome de la dourine.	Souris, lapin, chien, cheval (sous la peau).	Rat d'égout.	Oiseaux, cobaye.	»
Trypanosome du nagana.	Souris, chat, chien, lapin, âne, cheval, mulet (sous la peau).	Cobaye, mouton, chèvre, bovidés.	Pigeon.	Le surra des Indes, identique au nagana, est inoculable au chameau.
Protéosoma des oiseaux.	Moineaux, canaris, becs croisés (sous la peau).	»	»	»
Virus rabique. . .	Chien, lapin, cobaye (sous la dure-mère).	Poule, oie, chouette, jeune pigeon.	Faucon, corbeau, pigeon adulte.	Virus dangereux à manier.

NOM DES MICROBES	ANIMAUX DE CHOIX	ANIMAUX PLUS OU MOINS RÉCEPTIFS	ANIMAUX RÉFRACTAIRES	OBSERVATIONS
Virus vaccinal. . .	Homme, singe, bovidés (scarifications).	Cheval, porc, lapin, poule et pigeon.	»	»
Virus variolique. .	Homme, singe (scarifications).	Vache. Vésicules sur la cornée du lapin, de la poule, du pigeon.	»	»
Virus de la fièvre aphteuse.	Bovidés, porc (injection dans les veines).	Chèvre, fox-terrier (si le virus est très actif).	Les autres animaux sont réfractaires, l'homme excepté.	Affection reproduite expérimentalement chez l'homme.
Virus de la peste bovine.	Bovidés, gazelle.	Porcs, moutons, chèvres (selon les races), chameaux.	»	»
Virus de la péri-pneumonie.	Bovidés (injection sous-cutanée).	»	«	»
Virus de la clavelée.	Moutons (inoculation par causications ou dans la trachée).	»	»	»

4° *Contention des animaux. Anesthèsie.*

Le choix de l'animal une fois arrêté, il faut mettre celui-ci hors d'état de s'échapper ou de gêner l'opérateur par ses mouvements; à plus forte raison de le blesser ou de le contaminer. Les moyens de contention varient naturellement avec les différentes espèces employées. Lorsqu'on dispose d'un aide, il suffit en général qu'il maintienne convenablement les animaux pour que presque toutes les inoculations se fassent sans difficultés. Si l'on est seul, on peut encore, en s'aidant de la main gauche et des genoux, contenir un cobaye ou un lapin ; l'enveloppement dans un torchon ou l'usage de la boîte en fer-blanc de Voges rendront également des services. Si on doit manier des animaux difficiles, tels que le chat, le chien, le rat, si l'on doit faire des inoculations particulièrement délicates (insérer par exemple un sac de collodion dans le péritoine), si l'on doit enfin injecter un produit dangereux, tel que le virus rabique, une culture de morve ou de peste, les procédés précédents ne suffisent pas et il faut recourir à la contention instrumentale. On a le choix entre deux méthodes : suspendre les animaux ou les attacher. La pince à mors ajourés, que représente notre figure (fig. 101), permet de saisir par la nuque un lapin ou un cobaye et de le suspendre à une tige quelconque faisant relief. Une pince à branches fines et longues permettra de suspendre un rat blanc ou une souris. Elle aidera aussi à les manier ; on applique alors les mors



FIG. 101. — Pince à mors ajourés.

le long du dos de l'animal ; la main gauche tient le



Fig. 102. — Mors de Malassez.

manche et la queue de l'animal, pendant que la main droite pratique l'inoculation. La contention du rat d'égout nécessite l'emploi de plusieurs pinces. Les rats, les lapins et les cobayes peuvent être fixés sur un plateau en zinc dont les bords relevés sont percés d'orifices. Aux quatre pattes, on fixe des lacs qui vont s'engager d'autre part dans les trous du plateau. Chez le rat, il est nécessaire de placer aussi une forte lanière en arrière des incisives supérieures. Cet appareil très simple suffit à pratiquer presque toutes les inoculations. Il convient aussi pour les oiseaux. Si une immobilisation plus complète était nécesaire, on maintiendrait la tête avec le mors de Malassez (fig. 102) ou on recourrait à l'appareil de Latapie (fig. 103). Ce dernier, très ingénieux, peut s'appliquer à la con-

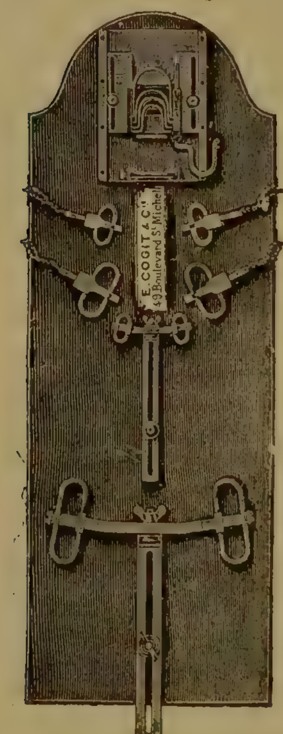


Fig. 103. — Appareil de contention de Latapie.

tention de tous les petits animaux de laboratoire. Il est malheureusement difficile à désinfecter et d'un prix de revient élevé.

Le chien, assez rarement employé en bactériologie, devra toujours être muselé; au besoin, on le fixera sur la gouttière de Cl. Bernard ou de Verdin (fig. 104).

Lors d'opérations très délicates ou particulièrement douloureuses, et surtout quand ces opérations doivent se prolonger quelque temps, il est indiqué

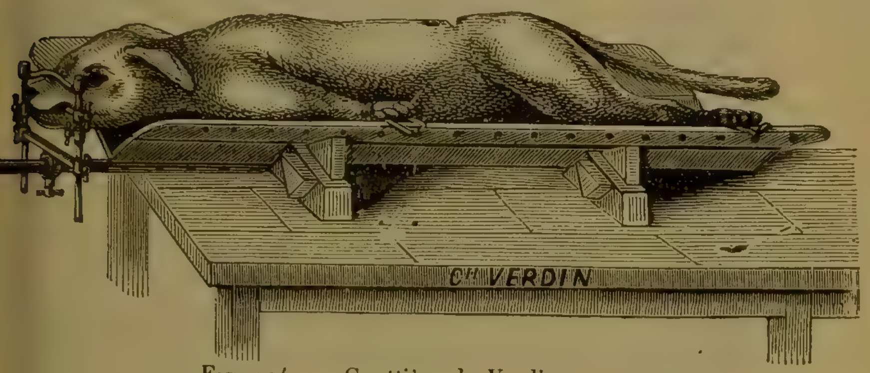


Fig. 104. — Gouttière de Verdin.

d'endormir les animaux. On recourt au chloroforme pour le lapin, le cobaye et le chien. L'anesthésique doit être donné aux deux premiers à dose massive; les animaux retiennent tout d'abord leur respiration, puis ils font quelques mouvements inspiratoires et ne tardent pas à s'endormir; on peut alors éloigner la compresse (remplacée le plus souvent ici par un simple cornet de papier filtre). On administre au contraire le chloroforme à dose fractionnée chez le chien. Notons que, chez tous les animaux, on doit éviter soigneusement le contact du liquide avec la muqueuse nasale, sinon on court le risque d'une syncope mortelle.

Pour endormir le rat et la souris, on jette un tampon d'ouate imbibé d'éther dans le bocal où ils se

trouvent et on ferme l'orifice supérieur de ce bocal avec une plaque de verre. Il faut se garder d'employer ici le chloroforme, qui tuerait rapidement les animaux.

Le cheval et les bovidés peuvent d'ordinaire être inoculés sans qu'il soit besoin de recourir à des moyens de contention. On applique le tord-nez aux

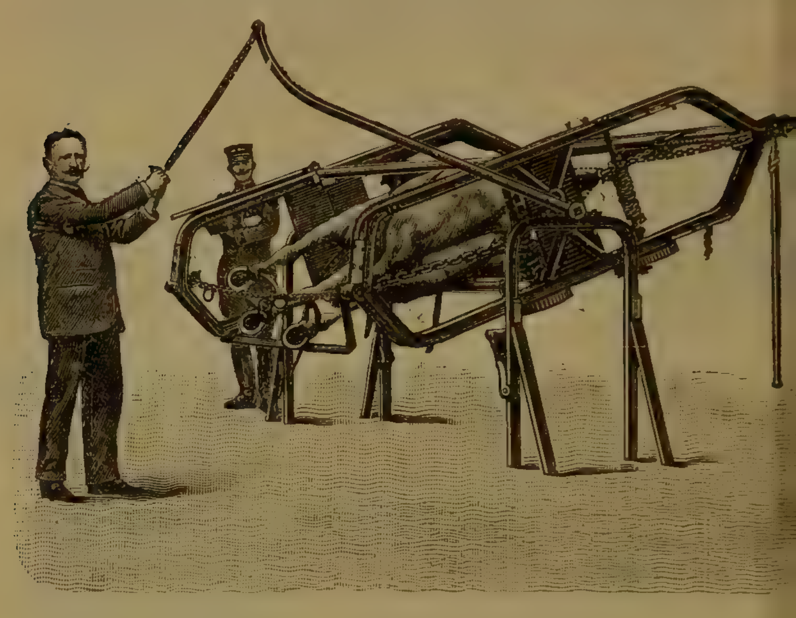


Fig. 105. — Travail-bascule de Vinsot.

chevaux indociles et un aide maintient en flexion un des membres antérieurs. Si ces moyens simples ne suffsent pas, on aura recours à un travail. L'appareil à bascule de Vinsot est très recommandable, mais coûteux (fig. 105-106). Si on n'a pas les moyens de l'acheter, on pourra en improviser un en bois ou mieux en métal. On pourra plus simplement attacher les quatre pattes de l'animal à des anneaux fixés dans le sol. Citons enfin les anneaux qu'on place dans le

nez des bovidés et le mors électrique du capitaine de Place, qui réussit souvent à immobiliser les chevaux et même les bovidés.

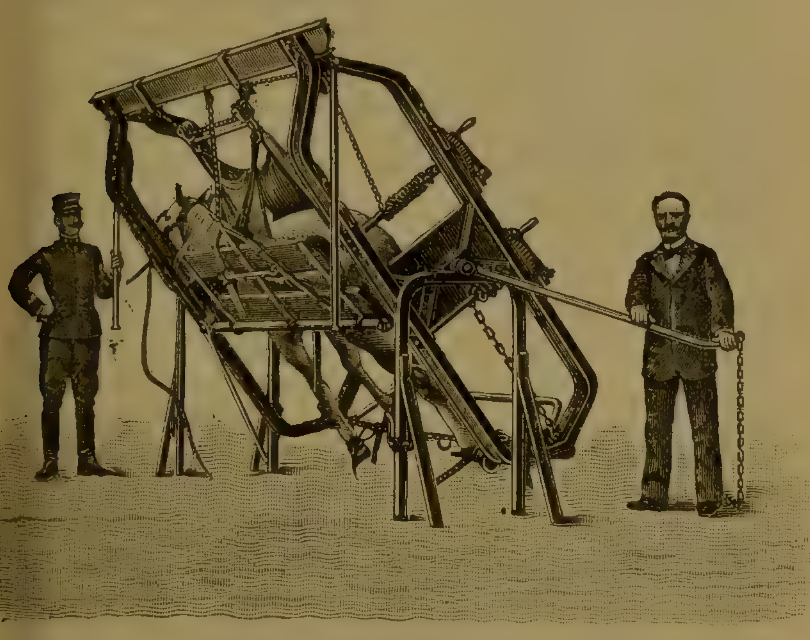


FIG. 106. — Travail-bascule de Vinsot.

Avant chaque inoculation, il faut toujours peser l'animal et prendre sa température.

5° *Modes divers d'inoculation.*

Nous étudierons successivement l'inoculation par injection, par insertion, par ingestion et par inhalation. Puis nous discuterons les indications respectives des divers modes d'inoculation.

A. **Inoculations par injection et par insertion.**

On commencera par couper les poils de la région

où doit se faire l'inoculation, ou même par les raser, si cela est nécessaire (chez les oiseaux, on arrache les plumes). La peau sera ensuite désinfectée. Dans un grand nombre de cas, il suffit de la frotter avant et après l'opération avec un tampon de coton ordinaire trempé dans les solutions de crésyl ou de tricrésol. Lorsqu'on a besoin d'une désinfection plus complète, on commence par savonner, en frottant vigoureusement à l'aide d'une brosse. On lave ensuite au sublimé puis à l'alcool et à l'éther.

Inoculations sous-cutanées. — Chez le lapin et le cobaye, on opère d'ordinaire sur l'abdomen ou la face interne de la cuisse. Ces régions sont commodes ; la peau y est mince et le tissu cellulaire doué d'une grande laxité. Chez le chien, qui se gratte et qui peut ainsi modifier la lésion locale et même déterminer des inoculations secondaires, on préfère souvent la peau du dos. Chez le rat et la souris, les injections se font d'ordinaire à la base de la queue ; il suffit de saisir la queue avec une longue pince et de l'attirer hors du bocal (fig. 107) où se trouve l'animal ; le couvercle (toujours pesant) de ce bocal sera rabattu de façon à immobiliser la base de la queue. Mentionnons enfin le choix de l'oreille (pour la reproduction de l'érysipèle chez le lapin par exemple) et le choix exceptionnel de régions où le tissu cellulaire est serré et offre une basse température, telles que la queue (pour la vaccination contre la péripneumonie par exemple).



Fig. 107. — Bocal à souris.

Inoculation par injection. — L'antisepsie de la région étant faite et la seringue chargée, on enfonce l'aiguille sous la peau et on s'assure qu'elle est bien libre dans le tissu cellulaire. L'injection doit

amener l'apparition d'une boule d'œdème plus ou moins accentuée. Celle-ci produite, on enlève la canule et on lave encore, comme il a été indiqué. Chaque fois qu'on pratique une inoculation sous-cutanée, il faut faire attention à ne pas pousser l'injection dans le muscle, car parfois les résultats obtenus seraient très différents. Si l'on a inoculé par exemple à un cobaye de la toxine diphtérique dans les muscles, et non sous la peau, il ne se produit aucun œdème, ce qui peut avoir une certaine importance (pour le titrage du sérum en particulier, comme l'a fait remarquer M. Fränkel). Si on inocule au cobaye de la toxine tétanique au niveau du tissu cellulaire du cou-de-pied ou de la queue, il s'ensuit un tétanos descendant ; si les muscles ont été piqués, c'est au contraire un tétanos ascendant qui se produit (Zupnik).

Inoculation par insertion. — On incise la peau ; on décolle plus ou moins le tissu cellulaire à l'aide de la sonde cannelée ou des ciseaux ; on insère bien profondément le corps que l'on désire introduire, en se servant de pinces fines, de manière qu'il ne vienne pas à ressortir ; puis on fait un ou deux points de suture. Nous recommandons de ne jamais employer le collodion.

Inoculations endermiques. — Elles sont d'un emploi beaucoup plus restreint que les inoculations sous-cutanées. Elles peuvent se pratiquer en piquant le derme avec une aiguille chargée du produit à inoculer ; en injectant ce produit dans une phlyctène obtenue à l'aide d'une brûlure superficielle ; ou mieux en scarifiant avec un bistouri flambé la peau bien aseptisée (éviter ici l'emploi des antiseptiques) et en portant le virus à la surface de ces scarifications. On aidera à la pénétration en frictionnant légèrement. Il faut éviter l'écoulement de sang qui entraînerait mécaniquement le produit virulent. On sait, depuis

les expériences de M. Garré, qu'on peut également inoculer certains microbes en frottant la peau intacte avec un tampon imbibé de produits virulents.

Les inoculations à la surface des muqueuses ou dans leur derme se pratiqueront de la même façon que les inoculations à la surface ou dans l'épaisseur de la peau. Pour la reproduction des fausses membranes diphtériques, il est indiqué de cautériser préalablement les surfaces, par exemple la muqueuse vaginale.

Inoculations intramusculaires. — Chez le cobaye et le lapin, la région de choix est la face externe de la cuisse, en raison de l'absence de gros troncs nerveux et vasculaires. Chez les oiseaux, on préfère les muscles pectoraux. A la profondeur près, la technique de l'injection ou de l'insertion intramusculaires est la même que celle de l'injection ou de l'insertion sous-cutanées.

Inoculations intrapéritonéales. — *Injection.* — Il est inutile d'inciser la peau. Pour éviter de blesser l'intestin, on peut se servir d'une double canule. On traverse d'abord la peau (rasée et désinfectée), puis les plans profonds au moyen d'une canule piquante et courte. Par la lumière de cette canule, on fera pénétrer ensuite dans la cavité abdominale une autre canule mousse, un peu plus longue par laquelle se pratiquera l'injection. On peut employer aussi une aiguille courbe spéciale dont l'unique orifice est situé au milieu du bord convexe. On fait un pli à la paroi abdominale et on enfonce l'aiguille de telle façon que la pointe ressorte et que la partie centrale seule se trouve dans le péritoine. Plus simplement, on saisira entre le pouce et l'index gauches toute l'épaisseur de la paroi abdominale, on traversera de part en part la base du pli ainsi formé avec une aiguille ordinaire; on enlèvera la main gauche, et,

le pli affaissé, on ramènera l'aiguille en arrière jusqu'à ce qu'on sente sa pointe libre dans la cavité péritonéale. On poussera l'injection et on retirera la canule directement. Enfin, avec un peu d'habitude, on peut faire directement l'injection dans le péritoine, en traversant perpendiculairement les parties molles. Lorsqu'on sent que l'aiguille a pénétré dans la séreuse, on la glisse le long du péritoine pariétal et on injecte.

Insertion. — On incise la peau au niveau de la ligne blanche. Puis on soulève l'aponévrose avec une pince et on sectionne la base du pli ; le péritoine est alors ouvert, sur une faible étendue. Par l'orifice ainsi produit on glisse une sonde cannelée, sur laquelle les ciseaux sectionnent toute la paroi d'un coup franc. On place rapidement une pince à forcipressure sur chacune des lèvres de la plaie ; on croise les deux pinces (qui doivent avoir saisi toute l'épaisseur de la paroi) de façon à empêcher l'issue de l'intestin. On introduit le produit virulent. On suture enfin séparément le péritoine, les muscles et la peau. Ces trois plans de suture sont indispensables pour éviter l'éventration.

Inoculations intrapleurales. (*Injection*). — Elles présentent sur les inoculations intrapéritonéales l'avantage d'une manipulation plus simple. D'autre part s'il s'agit de produire un exsudat destiné à être recueilli, celui-ci ne court pas risque de contamination de la part des bactéries intestinales. Malheureusement on ne peut injecter dans la plèvre qu'une faible quantité de liquide. Après antisepsie de la peau de la paroi thoracique, on traverse avec l'aiguille le 6e ou le 7e espace intercostal droit, à égale distance du sternum et du rachis. On dirige ensuite l'aiguille le long de la paroi et de bas en haut, pour éviter le poumon ainsi que le dôme du diaphragme. Une injection intrapulmonaire se pratiquerait de façon

identique, mais on enfoncerait la canule tout droit et plus profondément.

Inoculations intracrâniennes. (*Injection*). — Les inoculations sous la dure-mère, d'un usage journalier dans les instituts antirabiques, se réalisent très simplement chez le lapin à l'aide d'un petit trépan dont la couronne mesure environ 5 millimètres de diamètre. L'animal est fixé sur le ventre. Un aide maintient la tête appliquée sur la paroi du plateau. Les poils ayant été coupés aux ciseaux courbes et la peau désinfectée, on pratique sur la ligne médiane, à hauteur de l'œil, une incision de 3 centimètres de longueur environ, allant jusqu'à l'os. L'aide écarte les bords de la plaie (on peut les maintenir également écartés avec un blépharostat). On applique, alors, sur la paroi osseuse et vers le milieu de l'incision, une couronne de trépan, en s'assurant de temps en temps de la profondeur à laquelle on a pénétré. Quand la rondelle est détachée, on l'enlève avec un crochet ou simplement avec une pince. La dure-mère apparaît. Le sinus longitudinal se dessine sous forme d'une traînée bleuâtre ; on pousse l'injection sous la méninge, en ayant soin de l'éviter. L'aiguille courbe sera pour cette opération préférée à l'aiguille droite. Si une petite quantité de liquide vient sourdre par l'orifice et s'étaler à la surface de la dure-mère, on l'essuie avec une boulette de papier de soie stérilisé. On suture la peau et on lave une dernière fois à la solution antiseptique. Pour éviter le sinus longitudinal supérieur, on trépane le chien au niveau de la fosse temporale. Les chèvres et les moutons se trépanent à la base d'une corne.

Les injections intracérébrales pourraient à la rigueur se pratiquer après trépanation, mais il est plus commode de recourir à un simple foret. Après avoir coupé les poils et brûlé la peau sur un point limité, on perfore

le crâne avec l'instrument ; on introduit l'aiguille par l'orifice ainsi formé et on pousse l'injection. Il suffit ensuite de cautériser la peau au point d'inoculation.

Inoculations intraoculaires. — Elles peuvent se faire par injection ou par insertion.

Injection. — On maintient l'œil ouvert avec un blépharostat, ou bien on le fixe avec le manche d'un scalpel appuyé sur la paupière inférieure. La conjonctive est ensuite lavée abondamment à l'eau stérilisée, puis cocaïnisée si besoin est. La seringue n'étant pas complètement pleine, on fait pénétrer l'aiguille au niveau du cercle sclérotico-cornéen, sans glisser entre les lamelles de la cornée. On aspire avec soin l'humeur aqueuse, en tirant le piston de la seringue, puis on pousse doucement l'injection. Il faut savoir que, quel que soit le produit injecté, l'humeur aqueuse devient louche aussitôt après l'injection et conserve cet aspect pendant quelque temps.

Insertion. — Pour introduire un produit dans la chambre antérieure, on instille quelques gouttes d'une solution de cocaïne à 1/50, puis on incise la cornée près de sa circonférence à l'aide d'un couteau à cataracte et, avec un fil de platine ou une pince à iridectomie, on engage ensuite dans cette incision le fragment à inoculer.

Les inoculations intra-oculaires permettent de suivre l'évolution de la lésion locale comme au travers d'une vitre et de faire des prises au moment voulu. Nous rappellerons que cette méthode élégante d'infection est due à Cohnheim.

Inoculations intraveineuses. — Chez le lapin, elles sont des plus faciles à pratiquer. On opère sur la veine marginale externe de l'oreille. Lorsque le vaisseau n'est pas suffisamment développé, on le fait saillir en donnant une chiquenaude sur le bord de l'oreille ou encore en touchant celle-ci avec un linge

imbibé d'eau chaude. Après avoir coupé les poils, on introduit l'aiguille dans la veine, en pénétrant d'environ un centimètre. On fixe l'aiguille à l'aide d'une pince américaine. On pousse doucement l'injection et on retire la canule en laissant la pince en place pendant une à deux minutes. On aura soin de bien purger la seringue d'air pour éviter les embolies. Lorsque l'injection est réussie, on voit le liquide passer dans la veine, qui pâlit et se distend pendant qu'il la traverse. Au contraire, quand l'aiguille n'a pas pénétré dans le vaisseau, il apparaît une boule d'œdème au niveau de la zone périvasculaire. Les veines les plus facilement accessibles varient suivant les espèces animales. Chez le cobaye, chez le rat, de même que chez les grands animaux, les injections se pratiquent dans la jugulaire. Chez le chien, on donne la préférence aux veines du jarret, chez les oiseaux, à la veine axillaire.

Inoculations intratrachéales. — Inciser la peau sur la ligne médiane du cou, puis dénuder la trachée avec une sonde cannelée et pousser l'injection entre deux anneaux. Chez les petits animaux il est bon de passer un fil dans la trachée pour l'attirer au dehors ; on l'immobilise ainsi et on évite les fausses manœuvres. Dans certains cas enfin, on ouvre la trachée et on excorie la muqueuse, sur laquelle on dépose ensuite le produit virulent. Les inoculations intratrachéales sont très faciles à pratiquer chez les oiseaux. Le bec est ouvert, la langue tirée au dehors et fixée à l'aide d'une pince. On a alors l'ouverture de la trachée sous les yeux et il est très simple d'y pénétrer avec l'aiguille courbe ou le fil de platine. Chez les grands animaux, on pénètre d'emblée (sans inciser la peau) entre deux anneaux. On est averti que l'opération est réussie par l'entrée de l'air dans la seringue, lorsqu'on tire le piston. Il est donc recom-

mandé de ne pas remplir complètement la seringue. Cette recommandation s'applique, avons-nous vu, aux injections dans la chambre antérieure ; elle est de mise également lors d'injections un peu délicates dans les veines des grands animaux (l'ascension d'un peu de sang dans la seringue indiquera alors qu'on a bien pénétré au sein du vaisseau).

Inoculations intrarachidiennes. — Prendre une aiguille légèrement courbe et l'introduire dans la boîte crânienne, en traversant la membrane qui unit l'occipital à l'atlas, puis contourner l'occipital en se servant de l'os comme conducteur pour ne pas léser le bulbe ou le cervelet. Chez le lapin la manipulation est facile. On s'aperçoit qu'elle est réussie lorsque le liquide céphalo-rachidien sort par la canule. Chez le cobaye, l'opération est plus délicate, mais en maintenant l'animal complètement immobile, on arrive, dans plus de la moitié des cas, à éviter les lésions nerveuses. Quand on pousse l'injection, il faut aller lentement pour ne pas augmenter brusquement la tension, du liquide céphalo-rachidien (Louis Martin).

Nous devons maintenant dire un mot de quelques modes d'inoculation plus exceptionnels. Nous empruntons leur description à l'excellente thèse de notre collègue Binot sur le tétanos splanchnique. La technique indiquée s'applique plus spécialement au cobaye.

Inoculations dans le testicule. — Maintenir l'animal sur le dos, à l'aide d'un appareil de contention. Si on expérimente sur le cobaye, chez qui la persistance du canal vagino-péritonéal permet au testicule de rentrer librement dans l'abdomen, commencer par faire descendre dans la bourse correspondante le testicule que l'on veut inoculer, en exerçant une pression sur la partie inférieure de l'abdomen. Un aide, maintenant le testicule en place, saisit la peau

au point le plus saillant avec d'une pince à dents. En soulevant la peau, il est facile, d'un coup de ciseaux, de pratiquer à ce niveau une boutonnière. On sectionne ensuite les enveloppes au bistouri, en évitant soigneusement de léser l'albuginée. On peut alors énucléer le testicule au travers de la boutonnière, qui doit être plus étroite que lui. L'organe, ainsi maintenu au dehors par l'étroitesse de l'ouverture, est entouré sur les côtés de tampons de papier de soie stérilisé. On pousse l'injection au centre de la masse testiculaire.

Inoculations dans le foie. — Sectionner transversalement la peau, au niveau de la base de l'appendice xyphoïde, sur une longueur de 2 centimètres, puis, saisissant la pointe de l'appendice, couper celui-ci à sa base. Tout en évitant de blesser les viscères, prolonger de chaque côté l'incision de la paroi à l'aide d'un coup de ciseaux qui suit le rebord costal. Placer alors sur les lèvres de la plaie deux pinces à forcipressure qui servent d'écarteurs. Saisir, entre les mors d'une troisième pince, le ligament suspenseur au ras du foie et sur la plus grande longueur possible. Il sera très facile alors de glisser l'aiguille d'une seringue près du ligament ainsi soutenu.

Inoculations dans le rein. — L'animal est maintenu couché sur le ventre. On passe la main sous la paroi abdominale et, à travers cette paroi, on soulève le rein en le portant en dehors et en arrière. On incise sur la saillie ainsi formée, en dehors de la masse sacro-lombaire. On dilacère ensuite le plan musculaire au moyen de la sonde cannelée, de manière à former une boutonnière au travers de laquelle on énuclée le rein, et on pousse l'injection dans le parenchyme.

Inoculations dans la carotide. — Pratiquer une incision au-dessus et en dehors de la fourchette sternale. Dissocier les parties molles et récliner les muscles en recherchant la trachée, à côté et en arrière de la-

quelle on trouve facilement l'artère. La dénuder sur une étendue d'un centimètre et demi puis passer au-dessous une bandelette de papier stérile aussi large que possible, repliée plusieurs fois sur elle-même. Deux ligatures sont ensuite posées, l'une définitive à la partie supérieure, l'autre provisoire à la partie inférieure. Une fois l'injection terminée et pendant que l'on retire la canule, un aide rend cette seconde ligature définitive.

Inoculations dans le canal médullaire des os. — On choisit ordinairement le fémur. Pratiquer une incision longitudinale de 3 centimètres, au niveau de la partie moyenne de la face antérieure. Écarter le muscle droit antérieur, en fléchissant un peu la cuisse de manière à obtenir plus facilement son relâchement. Détacher avec une forte sonde cannelée toutes les insertions musculaires de la ligne âpre au ras de l'os. Perforer celui-ci avec une grosse aiguille d'acier montée sur une seringue et employée comme vrille, puis, à l'aide d'une seringue armée d'une aiguille de même calibre que la précédente, pousser l'injection dans le canal médullaire.

Inoculations dans le diaphragme. — Bien endormir l'animal. Au niveau de la dernière fausse côte et suivant le rebord costal, pratiquer une incision de 3 centimètres de longueur à partir de l'appendice xyphoïde. Saisissant alors le plan musculaire au moyen d'une pince à dents et le soulevant fortement, sectionner la paroi dans toute son épaisseur, puis d'un coup de ciseaux en avant et en arrière, agrandir l'incision ainsi faite, qui répondra exactement à celle de la peau. Éviter de blesser le foie et les intestins. Placer une pince à forcipressure sur la lèvre inférieure de la plaie. Sur la lèvre supérieure, placer une autre pince parallèlement à l'incision et enrouler cette pince par un mouvement de torsion autour de

son axe, pour amener à l'extérieur les insertions costales du diaphragme dans lesquelles il est très facile de faire l'injection.

Inoculations intraganglionnaires. — A peu près impossibles à pratiquer dans les ganglions sains des petits animaux de laboratoire mais très faciles, au contraire, à réaliser lorsqu'un état pathologique a déterminé l'augmentation du volume de ces organes. Les ganglions tuberculeux conviennent fort bien, à moins de contre-indication spéciale.

Inoculations intranasales. — Elles ont été appliquées récemment par MM. Roux et Batzarow à l'étude de la pneumonie pesteuse. Il suffit d'écouvillonner la muqueuse des fosses nasales avec un tampon monté, trempé dans une émulsion de culture sur gélose ou d'organes infectés ; mais il faut savoir que, dans l'exemple choisi, ces inoculations ne sont pas exemptes de danger pour les expérimentateurs.

B. Infection par inhalation.

L'infection par inhalation s'obtient en pulvérisant une culture liquide ou une émulsion avec un appareil de Richardson, ou mieux, lorsque le produit peut être desséché sans diminution sensible de virulence, en incorporant celui-ci à de la poudre de lycopode, et en pulvérisant à l'aide d'un soufflet. L'infection par inhalation comporterait pour l'expérimentateur un grave danger, si elle n'était pratiquée dans des boîtes closes. Celles-ci ne présenteront que deux petits orifices, l'un permettant l'introduction du pulvérisateur et l'autre (muni d'ouate) le renouvellement de l'air.

C. Infection par ingestion.

Elle peut se réaliser simplement en répandant

sur la nourriture des animaux la matière infectante. On peut incorporer une culture à du son, tremper des débris de légumes dans une culture étendue d'eau..., etc. On peut aussi bâillonner un lapin ou un cobaye avec un rectangle de fil de fer, ou une plaque de liège percée d'un trou, et introduire, jusqu'à l'estomac, une sonde œsophagienne par laquelle on poussera l'injection virulente. L'infection par ingestion ne réussit souvent qu'autant que l'acidité du suc gastrique a été préalablement neutralisée et qu'on a paralysé le péristaltisme intestinal. M. Koch, dans ses expériences sur le choléra des cobayes, commençait par introduire dans l'estomac 5 centimètres cubes d'une solution à 5 pour 100 de bicarbonate de soude. Il injectait ensuite dans le péritoine, par 200 grammes du poids de l'animal, un centimètre cube de teinture d'opium. Il est bon de rappeler à ce sujet que la teinture d'opium de la pharmacopée française est plus forte que celle de la pharmacopée allemande. D'après M. Cantacuzène, il faut en injecter seulement un centimètre cube par 320 grammes du poids de l'animal. M. Koch et ses élèves ont recommandé, pour infecter les gros animaux, l'emploi de pommes de terre creuses, remplies de la matière virulente. M. Löffler, dans ses études sur la fièvre aphteuse, s'est servi des capsules de gélatine. Pasteur pour le charbon, MM. Baümgarten et Orth pour la tuberculose ont imaginé de mélanger des corps piquants aux bacilles ingérés, afin de favoriser leur pénétration à travers les muqueuses. Notons qu'il est souvent bon de faire jeûner les animaux pendant 24 heures pour les forcer à accepter les aliments contaminés qu'on leur donne et aussi pour rendre l'infection plus certaine. Cette infection nécessitera enfin, dans certains cas, l'emploi concomitant de microbes dits favorisants (choléra expérimental des

jeunes lapins), ou l'emploi préalable du régime lacté, continué pendant quelques jours (fièvre typhoïde expérimentale).

On préfère quelquefois pratiquer, après laparotomie, des injections de cultures dans le duodénum (Nicati et Ritsch). Pareillement, MM. Lépine et Lyonnet, dans leur étude sur la fièvre typhoïde expérimentale, ont introduit le bacille d'Eberth dans une anse de Thiry. Citons enfin les injections rectales, usitées dans les tentatives de reproduction expérimentale de la dysenterie.

D. Indications respectives des principaux modes d'inoculation.

Les divers modes d'inoculation présentent une *gravité* variable et, conséquemment, des indications variables, que nous mentionnerons en nous limitant aux cas usuels. De plus, certains microbes manifestent, suivant la voie employée, une *différence d'action* considérable. Ainsi, chez le jeune lapin, l'ingestion du vibrion de Koch détermine un choléra intestinal identique au choléra humain, tandis que l'inoculation sous-cutanée demeure à peu près sans effet. Même avec les toxines, on peut obtenir des résultats fort variés, suivant qu'on inocule celles-ci de telle ou telle manière. Avec le poison tétanique, par exemple, on reproduira à volonté, ou bien le tétanos de contracture (le plus souvent ascendant, quelquefois descendant), ou bien le tétanos dit cérébral, ou bien encore le tétanos dit splanchnique.

L'inoculation sous-cutanée, la moins grave de toutes, sera de mise : 1° quand le produit à inoculer n'est pas pur (pus morveux, crachats tuberculeux) ; 2° quand il s'agit d'un animal très sensible, et que chez lui ce mode d'inoculation est le plus facile

(souris et pneumocoque) ; 3° lorsqu'on veut prolonger le plus longtemps possible l'infection (tuberculose, morve) ; 4° lorsqu'on désire reproduire un accident local (érysipèle chez le lapin).

L'inoculation endermique est parfois la seule possible (vaccine). Ailleurs, elle constitue un criterium préférable aux autres (emploi des scarifications sur le front du chien ou de l'âne, pour le diagnostic de la morve).

L'inoculation sur les muqueuses représente tantôt un mode courant d'infection (fièvre aphteuse), tantôt un moyen de reproduire certaines lésions (fausses membranes diphtériques).

L'inoculation intramusculaire convient à l'étude des anaérobies. Elle est aussi très usitée chez les oiseaux, à la place de l'inoculation sous-cutanée, en raison de sa facilité et de la minceur de la peau de ces animaux.

L'inoculation intrapéritonéale nécessite, comme les suivantes, l'emploi d'un produit pur. Elle trouvera surtout son indication : 1° quand il s'agit d'un animal, le cobaye par exemple, chez lequel elle est plus facile que l'inoculation intraveineuse ; 2° quand elle donne lieu à certaines lésions caractéristiques (cobaye mâle et morve) ; 3° quand on veut obtenir un abondant exsudat, facile à prélever.

L'inoculation intracrânienne (sous dure-mérienne ou intracérébrale) détermine généralement des accidents très rapides et très graves. Elle convient aussi à l'étude de la rage, dont le virus se cultive électivement dans les centres nerveux.

L'inoculation intra-oculaire sera usitée : 1° lorsqu'on veut suivre le développement des lésions (tuberculose) ; 2° lorsqu'on veut inoculer le plus près des centres nerveux, mais non dans l'épaisseur de ceux-ci (rage) ; 3° lorsqu'on veut enfin reproduire certaines lésions oculaires.

L'inoculation intraveineuse constitue le plus souvent un mode très grave d'infection, mais parfois aussi un procédé de vaccination (clavelée, charbon symptomatique, septicémie de Pasteur, rage chez les herbivores).

L'inoculation dans la trachée permet de reproduire le croup typique (lapin) ; elle engendre souvent des lésions pulmonaires ; enfin, elle représente un moyen courant de déterminer l'infection claveleuse.

Nous n'insisterons pas sur les autres modes d'infection.

6° *Moyens employés pour vaincre la résistance des animaux.*

Il est urgent, lorsque pour une raison ou une autre on opère avec un virus très peu actif au regard de l'espèce qui va être inoculée, de connaître des moyens permettant de vaincre la résistance de cette espèce.

Ces moyens sont des plus variés. Nous avons résumé les principaux dans le tableau ci-joint. Comme on le voit, le problème comprend trois facteurs : le *microbe*, l'*animal*, le *mode d'inoculation*. En s'inspirant des exemples que nous rapportons, on pourra réussir dans nombre de cas. Mais il faut savoir que certaines affections, propres à une espèce animale, n'ont jamais pu être transmises à d'autres, quels que fussent les artifices employés.

Pour compléter notre tableau, nous dirons un mot des moyens employés pour localiser les infections, c'est-à-dire, si l'on veut, pour vaincre la résistance de tel ou tel organe ou tissu. Certains microbes ont une électivité absolue pour un système organique (vaccine) et certaines races de microbes se cultivent plus particulièrement en des points déterminés (coli-

bacille de l'endocardite); mais la majorité des organismes ne manifestent aucune tendance semblable. Il faut donc user d'artifices pour la leur imposer et encore ne réussit-on que dans quelques cas. En inoculant par exemple un staphylocoque modérément virulent dans les veines des jeunes lapins, on reproduira souvent des ostéomyélites; en traumatisant les articulations des animaux tuberculeux, on pourra faire naître des tumeurs blanches; si on lèse l'endocarde ou les valvules du cœur, divers microbes injectés dans les veines iront se développer aux points altérés, etc.

MOYENS EMPLOYÉS POUR VAINCRE LA RÉSISTANCE DES ANIMAUX

1° Facteur microbe.

- A. Dose. — On donne le charbon aux moutons algériens en leur injectant une grande quantité de b. anthracis (Chauveau). Le rat prend la fièvre typhoïde si on lui fait avaler le bacille d'Eberth à doses massives (Remlinger).
- B. Virulence. — Il faut noter que l'augmentation des doses ne produit pas forcément les mêmes effets que l'augmentation de virulence.
- C. Adaptation préalable.
  - a) *Aux conditions thermiques.* — M. Dieudonné a rendu la bactéridie charbonneuse pathogène pour les pigeons en l'adaptant à la température de 42°, pour les grenouilles en l'adaptant à 10°.
  - b) *Aux humeurs.* — M. Nocard, cultivant le bacille tuberculeux humain en sac dans le péritoine du coq, l'a transformé en bacille aviaire après 3 passages de plusieurs mois chacun.

2° Facteur animal.

- A. Conditions physiologiques.
  - a) *Espèce, race.* — En général les races perfectionnées sont moins résistantes que les races vulgaires.
  - b) *Age.* — Les jeunes animaux sont plus sensibles au charbon que les adultes (chien, chat, porc, rat blanc, pigeon). D'une façon générale ils sont plus réceptifs que les adultes, vis-à-vis de la plupart des infections. Cependant les porcelets au-dessous de 3-4 mois ne prennent pas le rouget.
  - c) *Gravidité.* — La chèvre pleine devient plus sensible à la peste bovine (Nicolle et Adil Bey).
- B. Conditions pathologiques.
  - a) *Débilitation antérieure.* — Le porc malade peut prendre la morve (Cadéac). La chèvre en état de cachexie aqueuse contracte aisément la tuberculose (Nocard). Le lapin affaibli est réceptif au charbon symptomatique (Galtier).
  - b) *Jeune.* Le pigeon qui a jeûné 8 à 9 jours prend le charbon, même si on le nourrit ensuite. Le pigeon inoculé et laissé à jeun prend également le charbon (Canalis et Morpurgo).
  - c) *Saignées.* — Elles rendent le lapin plus sensible au staphylocoque (Gärtner).
  - d) *Surmenage.* — Les rats qui ont tourné longtemps dans un cylindre prennent plus facilement le charbon et le charbon symptomatique (Charrin et Roger). Boulay avait déjà signalé il y a longtemps que les chevaux surmenés contractaient plus aisément la morve.

2° Facteur animal (*suite*).

B. CONDITIONS PATHOLOGIQUES (*suite*)

g) *Diabète expérimental.* — **L'ingestion de phlorhydzine accroît la sensibilité de la souris blanche à la morve** (Léo).

h) *Intoxication proprement dite.* — La grenouille, le pigeon, le chien chloralisés prennent le charbon. — Le chien alcoolisé, la grenouille curarisée, le rat chloroformé également (Platania, Klein et Coxwell).

i) *Injection de toxines solubles ou de microbes morts. Injection de microbes vivants, pathogènes ou saprophytes.* — On confère le charbon symptomatique au lapin en lui injectant de la sérosité filtrée dans les veines et du virus vivant sous la peau ; ou en lui injectant des cultures vivantes ou mortes de prodigiosus associées au b. chauvœi (Roger). Un bacille d'Eberth inoffensif devient dangereux pour le cobaye si on injecte en même temps une culture filtrée de streptocoques (Chantemesse et Widal). Il faut savoir cependant que l'injection de microbes vivants ou morts favorise parfois la résistance.

j) *Entraves apportées évidemment à la leucocytose.* — Le chien prend le charbon quand on lui introduit préalablement une émulsion fine de charbon de bois dans les veines (Platania). Le lapin dératé devient plus sensible au charbon (Bardach). Le singe dératé meurt de la fièvre récurrente (Soudakewitch).

k) *Entraves apportées évidemment à la phagocytose.* — **Procédés mécaniques.** — Le cobaye prend le tétanos lorsqu'on l'infecte avec des spores pures (chauffées 3 heures à 80°), soit placées dans du papier ou dans de petits cubes de gélose, soit introduites dans une ecchymose ou sous une escarre (Vaillard) — On confère la pourriture d'hôpital au lapin en l'inoculant dans les muscles dilacérés (Coyon). On reproduit la lymphangite de Nocard en injectant le bacille pathogène dans les tissus mécaniquement altérés.

Procédés biologiques. — On confère le tétanos au cobaye en inoculant les spores tétaniques pures avec divers microbes dits favorisants ou avec un peu d'acide lactique au cinquième (Vaillard).

3° Facteur mode d'inoculation.

Nous rappellerons que :

L'inoculation intracérébrale est ordinairement la plus grave.
L'inoculation dans les veines est très grave le plus souvent.
L'inoculation dans la chambre antérieure ou les séreuses se révèle presque toujours comme très sévère.
L'inoculation dans les muscles est souvent plus dangereuse que l'inoculation sous-cutanée.
L'injection endermique est parfois seule suivie d'effet.

7° *Soins à prendre après l'inoculation. — Observation des animaux inoculés.*

Lorsqu'un animal a été inoculé, on lui met une marque (à l'oreille, pour les mammifères) et on le place dans une cage bien désinfectée par lavage au crésyl ou flambage au gaz. Les cages seront garnies d'une litière propre qui devra être fréquemment renouvelée, quotidiennement s'il s'agit d'insertions sous la peau de l'abdomen ou dans le péritoine. Lorsqu'il n'y a pas à craindre de contamination, on peut mettre plusieurs animaux dans une même cage. Les cages devront être étiquetées avec soin, surtout quand on a beaucoup de sujets en expérience. Si la maladie inoculée est dangereuse pour l'homme (morve, par exemple) ou facilement transmissible d'animal à animal, il convient de prendre des précautions toutes particulières d'isolement et de désinfection.

La température des animaux inoculés sera prise ordinairement deux fois par jour et inscrite sur une feuille quadrillée, analogue à celles dont on se sert en médecine humaine. La température se prend dans le rectum, avec des thermomètres spéciaux pour les petits animaux. On se souviendra que les températures des principaux animaux d'expérience sont les suivantes :

Lapin.	39°,5 à 40°
Cobaye.	38°,5 à 39°
Pigeon.	42°
Poule.	42°,2
Canard.	42°
Oie..	41°,5
Dinde.	42°,5
Chèvre et mouton. . . .	38°
Cheval et âne..	37°,5 à 39°,5
Bœuf.	38°,5 à 39°,5

Les animaux sont observés journellement avec le

plus grand soin et l'attention doit se porter successivement sur les symptômes locaux (point d'inoculation) et sur les symptômes généraux. La lésion locale n'est pas constante. On sait d'ailleurs qu'il existe souvent une sorte d'antagonisme entre cette lésion et les phénomènes généraux. Plus est grande la virulence du microbe inoculé et plus il y a en effet de tendance septicémique. Inversement, l'importance de la lésion locale décroît d'ordinaire à mesure qu'augmente l'activité du virus. C'est ainsi que si on inocule sous la peau de l'oreille du lapin une série de streptocoques de moins en moins virulents, on observe la gamme descendante suivante : septicémie rapide avec œdème à peine appréciable au point inoculé ; érysipèle type suivi de septicémie ; érysipèle sans septicémie ; abcès local ; érythème fugace (Achalme). Lorsque la lésion locale existe, on notera la date de son apparition, son étendue, son évolution, le retentissement qu'elle peut avoir sur l'appareil ganglionnaire. Nous citerons parmi les principales lésions qu'il sera donné d'observer : les œdèmes (charbon, par exemple), les fausses membranes (diphtérie), les abcès (streptocoques, staphylocoques), les gangrènes (anaérobies), les granulomes (tuberculose), etc. Comme symptômes généraux, nous mentionnerons, outre la fièvre et l'amaigrissement, la perte d'appétit, la diarrhée, le météorisme, les paralysies, les convulsions toniques ou cloniques ; la dyspnée ; les modifications du caractère, de l'attitude ; les changements dans l'aspect des poils, des muqueuses, etc.

Lorsque la fin de l'animal sera proche, on redoublera de vigilance afin de pouvoir pratiquer l'autopsie aussitôt après la mort. Dans certaines circonstances, on pourra abréger la vie du sujet, afin de se mettre plus sûrement à l'abri de la généralisation (agonique ou post mortem) des microbes intestinaux. Un autre

moyen consiste à faire mourir les animaux dans la glacière.

8° *Maladies expérimentalement transmises à l'homme.*

Nous n'avons eu en vue jusqu'ici que les maladies expérimentalement conférées aux animaux. Il faut savoir cependant qu'un certain nombre d'affections ont été reproduites chez l'homme, soit que leur transmission ait été la conséquence d'une contamination accidentelle, soit que des personnes de bonne volonté se soient offertes pour servir aux expériences, soit enfin que l'inoculation ait été pratiquée à l'insu du patient par des expérimentateurs peu scrupuleux.

Chacun sait qu'Helmann et Protopopoff, entre autres, moururent de la morve, contractée au laboratoire. Le charbon a pu être inoculé à la lèvre d'un bactériologue par une cigarette dont l'extrémité avait été souillée d'une trace de culture. M. Lejars a raconté récemment à la Société de Chirurgie l'histoire d'un malheureux étudiant qui, ayant aspiré par mégarde une culture très virulente de b. d'Eberth renfermée dans une pipette mal obturée, prit la fièvre typhoïde et mourut de perforation. Nous pouvons encore citer le cas de M. Nicolas, qui s'étant blessé avec un éclat de verre souillé de toxine tétanique, eut un tétanos heureusement bénin. Mentionnons enfin la petite épidémie de peste de Vienne (1898), qui a rendu bien injustement suspects les laboratoires bactériologiques.

Un certain nombre de personnes se sont offertes, après MM. Pettenkoffer et Emmerich, à absorber des cultures pures de vibrions cholériques, pour qu'on pût étudier les effets pathogènes de ces organismes. Beau-

coup d'autres se sont prêtées soit aux inoculations de sang malarique, soit aux piqûres d'anopheles et ont vu évoluer chez elles une fièvre intermittente typique. M. Metchnikoff s'est, après M. Motzutkowski, inoculé la fièvre récurrente. Citons encore le cas de Carrion, qui, s'étant injecté du sang d'une personne atteinte de verruga bénigne, contracta la forme aiguë à laquelle il succomba, démontrant ainsi, trop parfaitement, l'identité jusqu'alors contestée des deux maladies.

Il est superflu d'insister sur ce qu'ont de profondément répréhensible les inoculations de tuberculose (Demet, Paraskowa et Zablonis) ou de cancer, pratiquées à l'insu du patient. Répréhensible également est la conduite de Fehleisen et de plusieurs autres qui inoculèrent l'homme un streptocoque hypervirulent, ou encore de ces médecins qui, pour étudier l'anatomie pathologique de la blennorrhagie, injectaient des cultures degonocoque dans l'urètre de tuberculeux dont ils escomptaient la fin prochaine.

9° *Prélèvement des produits pathologiques in vivo.*

Le prélèvement des produits pathologiques diffère peu suivant qu'il se pratique chez l'homme malade ou chez l'animal en expérience. Nous en donnerons donc une description unique, passant successivement en revue les principaux cas qui peuvent se présenter.

1° **Sang**. — S'il s'agit d'un examen microscopique simple, il suffit de savonner la pulpe du pouce du malade ou, après section des poils, une région facilement accessible d'un animal (l'oreille par exemple). Nous recommandons de recouvrir ensuite la peau d'une couche de collodion ; on évite ainsi d'encombrer la

préparation avec les débris épidermiques et les amas de germes qui leur adhèrent. A l'aide d'une aiguille, stérilisée par un passage rapide dans la flamme, on pique à travers le collodion. On applique une lame de verre très propre sur la goutte de sang qui apparaît et, avec le bord d'un carton souple (que l'un de nous emploie depuis longtemps systématiquement pour l'étalage du sang), on répartit en couche très mince à la surface de cette lame. On laisse sécher à l'air, en favorisant au besoin la dessiccation par l'agitation de la lame, ou son passage rapide au-dessus d'une flamme. On pourrait aussi recevoir le sang sur une lamelle et recouvrir cette lamelle d'une autre, en les croisant. Lorsque le sang s'est bien étalé (il est nécessaire pour cela que le verre soit extrêmement propre), on sépare par glissement les deux verres, sans les écarter ni les comprimer. Chez l'homme, quelques auteurs préfèrent piquer le lobule de l'oreille plutôt que la pulpe digitale. Dans la première de ces régions, en effet, la peau est très fine et la piqûre à peine sentie.,

S'il s'agit du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde, où l'on a besoin d'une quantité de sang plus considérable, on fera l'antisepsie de la pulpe du pouce, en évitant de laisser des traces de désinfectant. On recouvrira la peau d'une couche de collodion et on la ponctionnera avec une forte lancette à vaccin, stérilisée par passage dans la flamme. On laisse couler le sang dans un tube à essai stérilisé. Il est bon d'en recueillir un centimètre cube. Aussi convient-il, pour favoriser son écoulement, de masser le pouce de sa base vers son extrémité. On abandonne ensuite le sang au repos dans un endroit frais, afin de permettre une coagulation régulière et la production d'un sérum clair. Lorsque celui-ci s'est séparé, on l'aspire dans une pipette stérile.

Quand on possède un centrifugeur et que l'on est pressé, on n'attend pas que le caillot se soit régulièrement formé; on prélève le sérum encore rouge et on l'éclaircit par essorage. Pour le séro-diagnostic, la méthode qui vient d'être indiquée suffit le plus souvent. Sinon, on procédera comme il va être dit.

Lorsqu'on désire faire des inoculations et des ensemencements, il est nécessaire d'une part d'opérer sur une certaine quantité de liquide, de l'autre d'éviter absolument toute contamination par les microbes de la peau. Le mieux est alors d'aller chercher le sang dans une veine. Chez l'homme, on choisit d'ordinaire la veine médiane céphalique. Après antisepsie du pli du coude, c'est-à-dire savonnage, puis lavages successifs au sublimé, à l'alcool et à l'éther, on disposera une ligature sur la partie moyenne du bras, comme pour la saignée. On introduira ensuite avec précaution, dans la veine distendue, l'aiguille de la seringue dûment stérilisée. Il convient de ponctionner sous une incidence très oblique et en suivant exactement le trajet du vaisseau. Lorsqu'on pense avoir pénétré dans son intérieur, on aspire légèrement en tirant sur la tige qui porte le piston. Si rien ne monte dans la seringue, on continue à enfoncer peu à peu l'aiguille jusqu'à ce qu'on ait réussi. Le sang est alors puisé progressivement. Quand la seringue est remplie, on enlève la bande qui serre le bras ; les veines s'affaissent immédiatement et on peut retirer l'aiguille sans qu'il sorte une goutte de sang par l'orifice qu'elle a produit. Sur cet orifice, on met simplement si l'on veut une légère couche de collodion. Le sang recueilli est immédiatement ensemencé ou inoculé.

On pourrait encore se procurer du sang en faisant une saignée avec une lancette flambée et en recevant

le liquide dans un récipient stérile. Ce procédé est moins sûr que celui qui vient d'être décrit. Encore moins sûre est la méthode qui consiste à s'adresser aux ventouses scarifiées.

Chez le lapin, le sang sera prélevé dans la veine marginale de l'oreille, ou encore dans les artères carotide ou fémorale ; chez le cobaye, dans l'une de ces artères ; chez le chien, dans la saphène externe, la carotide ou la fémorale ; chez les oiseaux, dans la veine axillaire ou la carotide ; chez les chevaux, les bovidés ou les petits ruminants, dans la jugulaire. Il n'est pas indifférent de savoir quelle quantité de sang on peut enlever à un animal sans compromettre sa vie. Cette quantité a été fixée, avons-nous dit, par les physiologistes, au cinquième environ de la masse total du sang. Les chiffres suivants, que nous empruntons à Colin d'Alfort, nous donnent d'autre part, pour les principaux animaux, le rapport du sang au poids total du corps. Ce rapport est 1/30 chez les bovidés ; 1/18 chez les solipèdes ; 1/24,5 chez le mouton ; 1/18 chez le chien ; 1/35 chez le chat ; 1/29 chez les oiseaux ; 1/29 chez le rat ; 1/35,5 chez le lapin.

2° **Pus.** — Quand il s'agit d'un abcès destiné à être ouvert, on rase la peau et on la désinfecte. La collection purulente est ensuite incisée à l'aide d'un bistouri stérilisé. Par la plaie ainsi créée, on introduit une pipette à effilure relativement large, par laquelle on aspire une certaine quantité de liquide. Si on désire faire un simple examen microscopique, on dépose à l'aide de la pipette une goutte de pus sur une lamelle ou mieux sur une lame et on étale suivant le cas à l'aide d'une autre lamelle ou d'un carton. Dans le cas d'une culture, on ensemence immédiatement les milieux nutritifs appropriés. Enfin, si on doit faire une inoculation, ou délaye dans un peu de bouillon ou

d'eau physiologique stérilisée et on injecte à la seringue.

On peut avoir à prélever du pus dans un abcès qu'on ne veut pas ouvrir. On l'aspire alors avec la pipette après avoir pratiqué une petite ponction au bistouri ou brûlé légèrement la peau au thermocautère. L'usage de la seringue est contre-indiqué, à moins que l'on ne possède une aiguille de gros calibre.

3° **Épanchements pleuraux, péritonéaux, etc.** — On ponctionne avec une seringue stérilisée les cavités qui les renferment. Si la quantité de liquide obtenue de cette façon était insuffisante pour le but qu'on se propose (par exemple, inoculation au cobaye d'un dépôt d'épanchement pleurétique centrifugé), on aurait recours aux procédés que nous avons décrits à propos de la récolte des sérosités.

4° **Urine.** — Chez l'homme et chez les grands animaux, on recevra l'urine dans un vase stérilisé après antisepsie des organes génitaux externes. Les premières portions qui pourraient être souillées ne seront point recueillies. Ce procédé est bien supérieur à l'emploi de la sonde. Les petits animaux seront fixés sur le dos ; après antisepsie des organes génitaux, on provoquera la miction en les aspergeant d'eau froide et on recevra, comme plus haut, l'urine dans un vase stérile.

5° **Larmes.** — Elles seront aspirées dans le grand angle de l'œil, à l'aide d'une pipette Pasteur.

6° **Selles.** — On les recueille aussitôt après l'émission dans un vase stérilisé.

7° **Produits bucco-pharyngés.** — On opérera de la façon suivante : s'il existe des fausses membranes, les enlever avec une pince ou avec un tampon de ouates hydrophile. S'il n'en existe pas, se contenter du mucus que peut recueillir le tampon de coton. Dans le premier cas, on essuiera la fausse membrane sur du

papier filtre stérile avant de faire des préparations ou des cultures.

8° **Crachats.** — On fait gargariser le malade à plusieurs reprises avec de l'eau stérilisée, puis on le fait tousser et cracher dans un verre flambé.

9° **Pièces provenant d'opérations chirurgicales** (tumeurs, produits tuberculeux, morveux, lépreux..., etc.). — On les enlèvera avec des instruments stérilisés, après antisepsie de la peau s'il s'agit d'une lésion non ulcéreuse, après simple lavage à l'eau stérilisée, si on a affaire à des produits ulcérés. On évitera soigneusement le contact des doigts ou des antiseptiques avec le produit à examiner, lequel sera placé dans un vase flambé.

10° **Suc pulmonaire.** — Le poumon se ponctionne comme la plèvre, mais en enfonçant l'aiguille davantage. On recueille ainsi quelques gouttes de sang qui peuvent être examinées au microscope et ensemencées.

11° **Suc splénique.** — Depuis la découverte du séro-diagnostic de la fièvre typhoïde, on a bien rarement l'occasion de ponctionner la rate. Le cas échéant, celle-ci se pratiquerait à la seringue, en se guidant sur la matité de l'organe et en faisant suspendre la respiration au malade, de façon à éviter des déchirements. On sait que les risques d'une hémorragie (laquelle peut être mortelle) sont d'autant plus grands que l'augmentation de volume est plus considérable.

12° **Liquide céphalo-rachidien.** — On le prélève à l'aide de la *ponction lombaire*, dont l'emploi tend à se généraliser pour le diagnostic des méningites. Le malade se couche sur le côté gauche et incline fortement la colonne vertébrale en avant ou bien s'asseoit en se tenant courbé. On enfonce une aiguille un peu longue, à quelques millimètres de la ligne médiane,

entre les lames de la 3ᵉ et de la 4ᵉ vertèbre lombaires. Le champ opératoire représente un espace de 10 à 15 millimètres de haut et de 18 à 20 millimètres de large ; la profondeur à laquelle il faut enfoncer l'aiguille varie chez les enfants entre 2 et 3 centimètres, chez les adultes entre 4 et 6.

CHAPITRE XII

AUTOPSIES HUMAINES ET ANIMALES. — PRÉLÈVEMENT DES PRODUITS SUR LE CADAVRE.

I. *Généralités.*

Une recommandation importante se pose tout d'abord, au sujet des autopsies humaines ou animales. Elle a trait à la nécessité de les pratiquer le plus tôt possible après la mort. MM. Würtz et Hermann ont indiqué en 1891 que les microbes intestinaux, et le colibacille en particulier, passent fréquemment après la mort dans le sang et les organes. Avant les recherches des auteurs précédents, Pasteur avait déjà montré que le sang des animaux charbonneux est rapidement envahi, surtout pendant la saison chaude, par le vibrion septique venu du tube digestif. Celui-ci ne tarde pas à supplanter la bactéridie charbonneuse, d'où les erreurs bien connues de Brauell et de Jaillard et Leplat. Pasteur avait expliqué également, par la migration du même vibrion septique, les résultats de la célèbre expérience de Signol. Un cheval est tué par asphyxie ; au bout d'un petit nombre d'heures, le sang des veines mésentériques est devenu virulent, virulence due au vibrion de Pasteur, qu'on surprend ainsi au cours de sa généralisation. Brauell ne l'avait-il pas trouvé jadis dans le sang d'un cheval mort d'une fracture du rachis ? Les recherches de MM. Lesage et Macaigne, Achard et Phulpin, Béco, Chvostek et Eger, ont confirmé l'existence de ces migrations *post mor-*

tem. Il semble résulter de certains de ces travaux que les microbes intestinaux peuvent déjà pendant l'agonie passer dans le sang de la circulation générale, mais la diffusion *post mortem* n'en reste pas moins incontestable d'après la majorité des auteurs. La réalité de cette diffusion est du reste prouvée par les expériences de M. Haüser qui, chez divers animaux et chez l'homme même, injecte, aussitôt après la mort et par diverses voies, des microbes pathogènes tels que le pyocyanique, le vibrion du choléra, le staphylocoque, etc., et les retrouve ensuite en des régions très éloignées de celle où l'injection a été pratiquée. La répartition des micro-organismes se montre très différente suivant la position donnée au cadavre; elle suit manifestement la déclivité. La température extérieure et l'existence de lésions intestinales ont une grande influence sur la rapidité avec laquelle s'effectue la migration. Les points envahis sont en premier lieu le foie, puis le sang du cœur, la rate et le rein. D'une façon générale, les microbes mobiles se généralisent plus vite que les autres. L'état de la flore intestinale au moment de la mort a également une grande importance. Il explique l'influence de l'espèce; ainsi, chez la souris le staphylocoque blanc est rencontré plus souvent que le colibacille. Enfin, la rapidité de l'envahissement microbien est inversement proportionnelle au volume du sujet. Trombetta avait déjà vu jadis que la putréfaction des animaux se montrait d'autant plus précoce qu'ils étaient de plus petite taille.

Les migrations *post mortem* ont pour conséquence de rendre difficile, dans bien des cas, l'interprétation des analyses bactériologiques. Il faut donc, chez l'animal, pratiquer l'autopsie aussitôt après la mort. Chez l'homme, le délai légal de 24 heures est trop considérable, surtout en été et dans certains pays, pour

que les résultats des examens et des ensemencements puissent être souvent acceptés sans réserve. Combien de fois ne restera-t-on pas dans le doute, en présence de lésions qui renferment le coli-bacille ? On devra naturellement faire tout son possible pour conserver les cadavres dans un endroit frais. Dans certains cas, on pourra aussi mettre d'accord la loi et les nécessités bactériologiques en pratiquant (à l'aide de ponctions inoffensives), aussitôt après la mort, des prélèvements de sang, de pus, de sérosités, etc., et en ne faisant l'autopsie proprement dite qu'à l'expiration des délais légaux. On comparera ensuite entre eux les résultats des deux expertises. Il va de soi que des lésions externes pourront très facilement être prélevées avant l'autopsie.

II. *Autopsies animales.*

Nous laisserons de côté ce qui a trait aux grands mammifères. La fixation des animaux est indispensable ; on ne saurait en effet mener à bien une autopsie un peu délicate si le cadavre n'est maintenu dans une immobilité absolue. Les souris seront placées, le ventre en l'air, sur une plaque de liège ; on les maintiendra à l'aide d'épingles qui traversent les membres. Les oiseaux de petite taille seront fixés semblablement à l'aide de trois épingles, l'une traversant le cou et les deux autres les pattes. Les cobayes et les lapins seront attachés solidement par les quatre pattes sur un plateau métallique à bords relevés pour éviter l'écoulement des liquides virulents et garnis de trous pour permettre le passage des cordons (plateau identique à ceux dont nous avons parlé lors des inoculations). De même pour le maintien des poules et des pigeons ; on commence par couper les plumes de l'extrémité

des ailes, puis on dispose trois lacs, l'un au cou, les deux autres aux pattes.

L'animal étant ainsi préparé, on sectionne les poils, ou on arrache les plumes, sur tous les points où doivent porter les incisions. On lave la peau avec une solution antiseptique, qui fixe en même temps les poils ou les plumes et les empêche de s'envoler dans le laboratoire. On explore ensuite les diverses parties du corps au point de vue des altérations qu'elles peuvent présenter (abcès, tuméfactions musculaires, articulaires, etc.). Le point d'inoculation sera l'objet d'un examen tout particulièrement attentif. On notera avec soin la lésion qui s'y trouve : œdème, escarre, collection purulente, ulcération, tumeur, etc.

L'exploration externe terminée, on pratique, aux ciseaux, une incision médiane allant du pubis au cou et n'intéressant que la peau. Cette incision est prolongée latéralement jusqu'à la racine des membres par quatre coups de ciseaux. Puis on détache la peau des parties sous-jacentes, à l'aide d'un scalpel, et on la rabat de chaque côté. On ouvre le ventre avec les ciseaux ; on coupe les insertions costales des muscles abdominaux, en respectant avec grand soin le diaphragme. On examine l'état du péritoine. On note, le cas échéant, la présence d'un épanchement, sa quantité, ses caractères. On peut le recueillir immédiatement avec une pipette ou une seringue pour l'ensemencer ou l'inoculer. Si on désire l'examiner sans coloration, on en dépose une goutte sur une lame ; on applique par-dessus une lamelle et on regarde au microscope. Si on désire l'examiner coloré, on dépose de même une gouttelette sur une lame ou une lamelle ; on étale en couche mince à l'aide d'un carton ou d'une autre lamelle disposée à angles discordants et on fait sécher. Au lieu d'épanchements, on trouve parfois, à la surface de l'intestin

ou des organes contenus dans la cavité abdominale, des exsudats purulents plus ou moins épais ; on les prélèvera avec une anse de platine.

On pourra aussi, à l'exemple de Pasteur, dans ses recherches sur le vibrion septique, faire des préparations microscopiques en frottant une lamelle à la surface de l'intestin ou du foie.

Après le péritoine, les recherches doivent porter sur les organes situés dans sa cavité. On étudiera d'abord la rate, plus ou moins hypertrophiée dans les maladies septicémiques. On notera le degré de cette hypertrophie, la saillie des corpuscules de Malpighi et la consistance du parenchyme, tantôt sec et grenu, tantôt au contraire mou et diffluent. Il est souvent indiqué d'examiner au microscope des préparations de suc splénique ; à cet effet un fragment de la rate est prélevé à l'aide de la pince et des ciseaux ; on frotte légèrement la surface de section sur une lame ou une lamelle, de manière à y laisser un enduit très mince ; puis on sèche à l'air. Si on voulait faire des ensemencements, on cautériserait la surface de l'organe avec une baguette de verre portée au rouge ou une tige de fer emmanchée dite « brûle-peau » ; à travers l'escarre ainsi produite, on introduirait l'extrémité d'une pipette Pasteur, dans laquelle on aspirerait la pulpe. On peut aider à cette aspiration à l'aide d'un mouvement de va-et-vient de la pipette, mais il faut faire attention de ne pas traverser l'organe de part en part, ce qui arrive facilement chez les petits animaux. Le contenu de la pipette est porté en milieu liquide ou sur milieu solide. Il peut également, après avoir été délayé dans du bouillon ou de l'eau physiologique, être injecté à un animal. Si on désirait ensemencer ou inoculer tout ou partie de la rate, on ferait le prélèvement avec des instruments flambés et on porterait le tissu soit dans un milieu de culture, soit dans un vase stérile. On

peut enfin détacher un fragment de l'organe pour le fixer et le débiter en coupes, qui seront ensuite colorées. Il faut alors prélever au bistouri des cubes de petites dimensions (10 à 15 millimètres de côté) que l'on plonge immédiatement dans un flacon bouché à l'émeri et rempli d'un liquide fixateur.

La rate étant étudiée, on passera à l'examen du foie. On note, s'il y a lieu, son hypertrophie, les modifications survenues dans l'aspect ou la consistance du parenchyme et l'état de la vésicule biliaire et de son contenu. Les frottis, les ensemencements, les prélèvements, etc., se pratiquent absolument comme pour la rate.

Les reins et les capsules surrénales sont examinés semblablement. L'attention doit se porter ensuite sur les ganglions mésentériques, hypertrophiés dans certaines affections.

On étudiera ensuite le contenu intestinal et la muqueuse du tube digestif. Si on désire simplement prélever le contenu de l'intestin, il suffit de cautériser la surface externe de celui-ci, d'introduire une pipette à travers l'escarre et d'aspirer. S'il était nécessaire d'examiner l'état de la muqueuse, l'intestin serait sectionné au niveau du pylore et du rectum, détaché de toute connexion avec le mésentère, étalé sur une plaque de liège et incisé sur toute sa longueur. On ne négligera pas non plus l'estomac.

S'il y a lieu, la vessie sera ponctionnée aseptiquement, l'urine aspirée et ensemencée. Mentionnons enfin l'examen des organes génitaux et celui des fœtus chez les femelles pleines.

L'autopsie de l'abdomen terminée, on ouvre le thorax, en sectionnant de chaque côté sa cage osseuse. L'intégrité du diaphragme a été maintenue avec soin lors de l'ouverture de la cavité abdominale, afin de s'opposer à toute souillure des organes thoraciques.

Dans certaines autopsies, celles par exemple des animaux qui ont succombé à des inoculations intrapleurales, il y a intérêt à commencer l'autopsie par le thorax et non par l'abdomen. Quoi qu'il en soit, on note l'état des plèvres, la présence d'épanchements, d'exsudats fibrineux ou purulents. On opère vis-à-vis d'eux comme vis-à-vis des produits péritonéaux. L'attention se porte ensuite sur le poumon, dont on note la congestion, l'hépatisation, la splénisation (si souvent confondue avec l'hépatisation)... etc., et qu'on traite comme les viscères abdominaux. On n'oubliera pas d'examiner minutieusement les orifices des petites bronches ; la pression en fera sortir, dans les bronchopneumonies suppurées, des gouttelettes purulentes qui seront examinées avec soin. Il faut ensuite ouvrir le péricarde et en étudier le liquide, au même titre que le liquide pleural ou péritonéal. Lorsqu'on désire recueillir le sang du cœur, on saisit avec une pince la pointe du ventricule gauche sans la déchirer ; on brûle fortement la face antérieure du ventricule droit avec une tige chaude ; on introduit une pipette dans la cavité cardiaque ; on aspire doucement, en imprimant à cette pipette un mouvement de va-et-vient, puis on l'enlève. Le sang peut être ensemencé de suite. On peut aussi avoir à l'examiner au microscope. Dans ce cas, on fera des préparations en suivant la technique indiquée précédemment. Si le sang n'est pas étudié immédiatement, on ferme l'effilure de la pipette à la flamme ; si même la pipette ne doit être utilisée qu'au bout d'un certain temps, on la transforme de suite en ampoule.

Lorsqu'on a examiné les ganglions de la partie supérieure du corps, on peut, s'il y a lieu, compléter l'autopsie par l'étude des muscles, des os, des articulations, du système nerveux. Pour prélever la moelle osseuse, on sectionne un os long perpendicu-

lairement à son grand axe. On cautérise, avec une tige de fer rougie, l'une des surfaces de section ; on fait pénétrer dans le canal médullaire l'extrémité d'une pipette stérilisée et on aspire. Les épanchements articulaires sont recueillis de même, après cautérisation de la synoviale.

Pour faire l'autopsie des centres nerveux, voici comment l'un de nous a coutume de procéder (la manipulation indiquée s'applique surtout au lapin). On commence par fixer solidement l'animal sur le ventre (le reste de l'autopsie ne sera pratiqué qu'ultérieurement). On incise la peau aux ciseaux depuis la racine du nez jusqu'à la base de la queue, en suivant la crête des apophyses épineuses. A l'aide du bistouri, on libère et on rabat la peau de chaque côté, de façon à découvrir complètement le crâne et la face postérieure du thorax et de l'abdomen. Les omoplates sont sectionnées au niveau de leur articulation humérale et rejetées sur les côtés. Avec une lame de bistouri ou la pointe des ciseaux, on détache complètement, à droite et à gauche des apophyses épineuses, les masses musculaires des gouttières, mettant ainsi à nu les lames vertébrales. On opérera avec précaution dans la région lombaire, de façon à ne pas pénétrer dans la cavité abdominale. Ceci fait, on coupe la crête des apophyses épineuses, les ligaments sus et inter-épineux et les détritus musculaires encore adhérents. On se rapproche, le plus qu'on peut, du canal médullaire, tout en évitant avec soin de l'ouvrir. Dans les régions cervicale et dorsale, l'opération est un peu délicate. Lorsque la colonne vertébrale a été parfaitement « nettoyée », on saisit la tête de l'animal avec un davier tenu de la main gauche et appliqué un peu au-dessous des yeux. La main droite, armée de la cisaille de Liston, sectionne successivement les arcades orbitaires droite et gauche.

Reprenant ensuite chacune des arcades sectionnées, on s'en sert pour dénuder par un mouvement de torsion tout le péricrâne. La cisaille coupe ensuite le frontal au niveau de son extrémité antérieure; elle le soulève et le détache. On découvre ainsi l'encéphale. Le reste des os du crâne est sectionné et enlevé. Bientôt le cervelet apparaît et on arrive au trou occipital. On examine les méninges, qu'on a évité avec le plus grand soin d'entamer. Après cautérisation de la face externe de la dure-mère, on peut pénétrer dans la cavité sous-jacente à l'aide d'une pipette et prélever les exsudats que cette cavité renferme. Le prélèvement fait, les méninges sont incisées, et le cerveau mis à nu sera facilement examiné en place ou après ablation.

On pénètre ensuite dans le canal vertébral, en sectionnant alternativement les lames à droite et à gauche et en les détachant. On enlève ainsi peu à peu la partie postérieure des vertèbres et on finit par découvrir la totalité de la moelle. Si on désire prélever un peu de pulpe nerveuse, on cautérise la surface de l'organe, on enfonce une pipette à effilure un peu grosse et on aspire. On peut aussi sectionner avec des instruments stériles de petits fragments qui serviront à faire des frottis ou des ensemencements. Quand il s'agit de détacher la moëlle, pour la soumettre à l'examen histologique, il devient nécessaire de ne pas la traumatiser (cette recommandation s'applique également aux nerfs périphériques). Les fragments (ou la moëlle entière) sont déposés sur de la ouate, dans des flacons bouchés à l'émeri et renfermant du liquide de Müller; ou suspendus dans le même liquide à l'aide de crochets qui traversent la dure-mère. Il faut toujours inciser celle-ci sur ses faces antérieure et postérieure pour permettre la fixation de la substance nerveuse.

L'autopsie terminée, l'animal est détaché, mis

dans une boîte métallique, puis brûlé dans un four spécial, ou simplement dans un poêle. En attendant, on fera bien de le recouvrir d'une feuille de papier filtre imbibée d'antiseptique, pour éviter les mouches. On immerge le plateau pendant plusieurs heures dans de l'acide carbolique à 5/1000 ou du crésyl à 2,5 pour 100. Quant aux instruments qui ont servi à faire l'autopsie, ils sont stérilisés par ébullition. Il faut toujours éviter de laisser les produits virulents (pus, sang, matière caséeuse..., etc.) se dessécher à leur surface parce que, dans ces conditions, la stérilisation est bien plus difficile, les micro-organismes étant emprisonnés dans une couche d'albuminoïdes coagulés qui les protège. On aura donc devant soi une casserole remplie d'eau et on y agitera les instruments à mesure qu'ils auront servi, afin de délayer les matières qui les recouvrent.

III. *Autopsies humaines.*

La manière de recueillir les produits pathologiques lors d'une autopsie humaine est identique à celle qui vient d'être indiquée. Aussi aurons-nous bien peu de choses à ajouter. Chez l'homme, comme chez l'animal, on commencera par procéder à l'examen externe du cadavre. Cet examen pourra déceler la présence d'abcès, de ganglions hypertrophiés, etc. Le cadavre étant ouvert, les exsudats, les fragments et pulpes d'organes, etc., seront prélevés comme d'habitude. Les cas où l'examen bactériologique de la rate est d'un appoint notable pour le diagnostic sont moins fréquents en médecine humaine qu'en pathologie expérimentale; on se rappellera toutefois avec fruit que la rate (et les ganglions profonds) résistent un certain temps à l'envahissement par les bactéries intestinales. Le tube digestif de l'homme est par contre beaucoup

plus intéressant que celui de l'animal ; il doit toujours être ouvert dans toute sa longueur. Les voies biliaires seront l'objet d'un examen minutieux ; il sera souvent indiqué de faire des ensemencements de bile. Les calculs des voies biliaires, comme du reste la grande majorité des calculs de l'économie, reconnaissent sans doute une origine bactérienne habituelle et pourront être étudiés à ce point de vue. L'autopsie sera terminée, le cas échéant, par l'examen des muscles, des os, et des articulations, par l'ouverture des cavités crânienne et rachidienne. La technique spéciale à ces deux dernières opérations sortirait de notre cadre. Nous nous bornerons à attirer l'attention sur la négligence apportée d'ordinaire aux ensemencements de pulpe médullaire. La littérature médicale abonde en observations de myélites infectieuses, où l'examen des coupes traitées par la méthode de Nissl permit de déceler la présence de cocci ou de bacilles, demeurés malheureusement indéterminés, car aucun ensemencement n'avait été pratiqué à l'autopsie. Rappelons (comme preuve de l'intérêt qui s'attache à l'étude bactériologique des myelites) qu'un de nous a publié en 1896 une observation de maladie de Landry où la nature microbienne de l'affection (streptocoque pyogène) fut établie pour la première fois par l'ensemencement et l'examen des coupes.

Le prélèvement des exsudats des méninges cérébrales est facile à effectuer aseptiquement après ablation de la calotte crânienne. Si on désirait recueillir le liquide d'une méningite rachidienne, il vaudrait mieux pratiquer une ponction lombaire aussitôt après la mort que de récolter l'exsudat à l'autopsie.

Notons enfin que chez l'homme, comme chez l'animal, il est souvent indiqué de peser et de mesurer exactement les organes.

CHAPITRE XIII

PRÉPARATION DES COUPES

Lorsqu'on désire étudier au microscope un fragment de tissu ou d'organe, il est nécessaire de lui faire subir un certain nombre de manipulations. La première consiste à conserver le mieux possible aux éléments anatomiques les caractères qu'ils possèdent à l'état vivant, c'est la *fixation*. Les objets fixés n'ont presque jamais une consistance qui permette de les couper. On y supplée, soit par le durcissement à l'aide de réactifs appropriés, soit, le plus souvent, par l'*inclusion* dans une substance suffisamment dure ou susceptible de le devenir. Puis on débite en sections fines à l'aide d'appareils spéciaux, les *microtomes*. Les coupes obtenues sont éminemment fragiles et difficiles à manier; aussi est-il avantageux de les *coller* à la surface de la lame, sur laquelle on pratiquera les colorations. Nous étudierons séparément les diverses opérations dont se compose la préparation des coupes, en nous plaçant toujours dans l'hypothèse d'une inclusion (on tend de plus en plus, en effet, à abandonner les coupes à main levée ou les coupes de pièces durcies et collées sur bouchon ; d'ailleurs pour certains organes, le poumon par exemple, l'inclusion est absolument indispensable).

I. *Fixation*.

Comme nous l'avons dit, son but est de rendre

les tissus inaltérables au cours des opérations ultérieures. Elle s'effectue à l'aide d'agents dits (naturellement) fixateurs que l'on emploie, sauf exceptions inutiles à mentionner, sous la forme liquide. Ces agents sont en même temps des coagulants et parfois des durcissants. Un certain nombre de conditions sont indispensables pour obtenir une bonne fixation :

1° Il convient d'opérer sur des fragments de tissus ou d'organes le plus frais possible. La chose est très facile en médecine expérimentale. En médecine humaine, il faut savoir qu'avec les délais légaux d'autopsie on rencontre toujours, à côté des lésions pathologiques, des altérations cadavériques dont l'importance est d'autant plus grande qu'on veut faire de l'histologie « plus fine ».

2° Les fragments seront toujours de faibles dimensions. On a toujours tendance à opérer sur des objets trop gros. Il ne faut prendre que de petits cubes (10 à 15 millimètres de côté, avons-nous déjà dit). Faute de cette précaution, la partie centrale s'altérera avant que le liquide ait eu le temps d'y pénétrer. Toutefois, si l'épaisseur des fragments est minime, on n'a à s'occuper ni de la longueur ni de la largeur.

3° Le volume du liquide doit être de 20 à 30 fois supérieur à celui de l'objet ; de cette façon, sa composition demeure sensiblement constante pendant toute l'opération. Pour permettre au liquide d'agir sur toutes les faces de la pièce, il est nécessaire de recouvrir de papier filtre ou de ouate le fond des récipients et de n'y déposer les fragments qu'après cette précaution prise. Les meilleurs récipients sont des flacons en verre ou des cristallisoirs à couvercle rodé. Ajoutons qu'il y a souvent avantage à renouveler le liquide fixateur.

La technique histologique utilise un grand nombre de liquides. L'acide chromique et l'acide osmique

permettent difficilement la coloration des microbes dans les tissus ; aussi étudierons-nous exclusivement la fixation par l'alcool et le sublimé. Notons toutefois l'emploi, déjà mentionné, de la liqueur de Müller pour les centres nerveux.

L'alcool est un fixâteur très commode, mais il a ses défauts. Excellent pour les bactéries, il se montre médiocre vis-à-vis des cellules ; de plus, c'est un durcissant, qui ne convient guère pour les tissus renfermant une grande quantité de fibres conjonctives, lorsqu'on veut recourir à l'usage de la paraffine. Au cas échéant, on traitera les fragments par des solutions de plus en plus fortes. Le tissu sera plongé d'abord dans l'alcool à 70°, puis dans l'alcool à 90° ; il séjournera 24 heures dans chacune de ces solutions. On terminera en l'immergeant dans l'alcool absolu. Quand les fragments sont très petits, on peut, pour gagner du temps, les durcir directement dans l'alcool à 100°.

Le sublimé représente un fixateur très supérieur à alcool. Il convient notamment pour les petits objets. On doit ensuite débarrasser les tissus de l'excès de réactif ; mais, malgré les lavages, il restera toujours des cristaux. On emploie parfois le sublimé sous forme de solution aqueuse saturée, que l'on prépare de la façon suivante. Prendre 8 grammes de sublimé et les faire dissoudre à chaud dans 100 grammes d'eau distillée. On filtre la solution chaude et on la laisse refroidir. Quand le fond du vase se tapisse d'aiguilles cristallines blanches, on prélève la quantité de liquide nécessaire et on y plonge les fragments pendant un à deux jours suivant leur grosseur. On les lave ensuite à l'eau courante pendant un jour ; pour cela il est avantageux de les enfermer dans une « boule à riz ». Au lieu d'eau courante on peut employer, bien entendu, une grande quantité d'eau fréquemment renouvelée. On se débarrasse des cristaux

qui persistent, en laissant séjourner la pièce pendant 24 heures dans de l'alcool à 70° contenant quelques gouttes de teinture d'iode. Le sublimé acide pénètre mieux que la solution aqueuse simple. Nous conseillons, pour les usages habituels, la formule suivante (plus faible que celle de Mayer) :

Sublimé.	3 grammes.
Acide acétique cristallisable. .	1 cent. cube.
Eau distillée.	100 grammes.

Les fragments à fixer séjournent en général 24 heures dans ce liquide. Ils sont ensuite lavés pendant 24 heures dans l'eau courante.

II. *Inclusion.*

Elle consiste à faire pénétrer les tissus par une matière assez résistante pour permettre de les couper, et assez molle pour ne pas abîmer les rasoirs. Les substances le plus communément employées sont la paraffine et la celloïdine.

A) **Paraffine.** — L'inclusion dans la paraffine comp end plusieurs temps : deshydratation dans l'alcool absolu ou l'acétone — pénétration par un liquide miscible à la fois au déshydratant et à la paraffine (xylol, toluène, éther, chloroforme, huile de cèdre, etc.) — pénétration par une solution de paraffine dans un de ces dissolvants — pénétration par la paraffine pure.

La déshydratation demande en moyenne 24 heures ; nous recommandons (d'après M. Sabouraud), d'employer l'acétone comme agent habituel. Il coûte moins cher que l'alcool absolu et ne durcit pas comme lui, avantage importent lorsqu'on a affaire à des tissus contenant beaucoup d'éléments fibreux.

Comme dissolvant de la paraffine, nous donnons la

préférence au xylol (ou au toluène). On y plongera les pièces, qui deviendront transparentes, si la déshydratation a été bien réussie. L'opération dure encore 24 heures.

Les fragments sont ensuite portés dans une solution de paraffine dans le xylol, en flacon fermé et à 37°. Ils se pénètrent en 24 heures (à la faveur du dissolvant et de la chaleur) d'une certaine quantité de paraffine.

On les place alors dans un bain de paraffine pure, en flacon ouvert et à 55°. L'opération demande quelques heures ; on est averti que tout le xylol s'est évaporé, lorsqu'en plongeant dans le bain une aiguille chaude elle ne provoque plus le dégagement de bulles gazeuses.

Il existe un grand nombre de paraffines, caractérisées par des points de fusion différents. L'hiver, on se servira de paraffines fondant vers 45° et l'été de paraffines fondant aux environs de 50°. Au sortir de la paraffine, les fragments doivent être jetés dans un moule. Il en existe divers modèles métalliques, dont on modifie à volonté la capacité par glissement des faces. On peut en improviser soi-même avec de petites caisses de papier. Les capsules à bouteilles (en étain) conviennent également. Nous recommandons enfin la technique suivante, qui s'applique aux pièces destinées à être débitées par certains microtomes. On prend un bouchon de liège, dont la base est susceptible de s'adapter à la pince du microtome ; on raccourcit ce bouchon de façon à ne laisser au liège qu'une hauteur d'un centimètre environ, et avec une pince à dissection, on creuse légèrement l'une des faces afin de faciliter l'adhérence de la paraffine. Le bouchon est alors surmonté d'un cylindre de papier filtre de 2 centimètres de hauteur, solidement fixé au liège à l'aide d'une épingle ou d'une ficelle.

Quel que soit le procédé employé, certains auteurs recommandent d'enduire la face interne du moule d'un peu de glycérine. Cette précaution n'est pas indispensable.

Pour terminer l'inclusion, on verse dans le moule la paraffine liquéfiée ; on y plonge ensuite le fragment à couper et on l'oriente convenablement à l'aide d'aiguilles légèrement chauffées. L'orientation opérée, on attend la formation d'une pellicule à la surface de la paraffine ; à ce moment, on immerge le moule dans de l'eau froide pour provoquer une prise en masse aussi prompte que possible. La paraffine refroidie lentement se coupe moins bien que celle qui a subi une réfrigération brusque et plus tard elle offre de la tendance à cristalliser. Après un séjour de quelques minutes dans l'eau, on sépare le bloc de paraffine du moule qui l'entoure.

Il faut noter que les tissus qui contiennent beaucoup de fibres conjonctives, la peau notamment et les organes scléreux, sont difficiles à pénétrer. On évitera cet inconvénient en donnant le moins d'épaisseur possible à la pièce (qu'on fixera exclusivement à l'aide du sublimé). On fera agir ensuite l'acétone et le xylol à 37°. La pièce, mieux déshydratée et mieux pénétrée de xylol, se laissera plus facilement imprégner de paraffine.

Si l'on est pressé par le temps, on taillera des fragments très minces et on réduira à une heure environ, par millimètre d'épaisseur, la fixation dans le sublimé, le lavage à l'eau, la déshydratation par l'acétone, l'immersion dans le xylol et le séjour à l'étuve dans le mélange de xylol et de paraffine. On peut aussi terminer l'opération en plaçant le flacon qui contient la paraffine fondue dans un bain-marie et en faisant communiquer ce flacon avec une trompe à eau. On évapore alors rapidement le xylol grâce au vide produit par la trompe.

B) **Celloïdine.** — La celloïdine présente l'inconvénient de fournir des coupes plus épaisses que la paraffine. Elle est néanmoins usitée dans certains cas, particulièrement pour le système nerveux, car tous les dissolvants de la paraffine sont aussi des dissolvants de la myéline. On fait 3 solutions de celloïdine : une première solution (la plus forte) dans parties égales d'alcool absolu et d'éther, cette solution doit offrir la consistance d'un sirop épais ; une deuxième, obtenue en allongeant une partie de la première d'un volume double d'éther ; une troisième enfin, préparée en diluant une partie de la seconde avec deux volumes d'éther. Les objets que l'on veut inclure sont transportés de l'alcool absolu dans l'éther, où ils restent 24 heures ; on les plonge ensuite dans la solution faible, où ils demeurent de 4 à 5 jours ; de là dans la solution moyenne, où ils restent le même temps et enfin dans la solution forte, où ils séjournent moitié moins. C'est dans cette dernière solution qu'on les inclut définitivement, en les versant avec elle dans une petite caisse en papier. Lorsque la surface commence à prendre un peu de consistance, on transporte le tout dans de l'alcool à 70°, où s'effectue le durcissement de la masse. Avant de faire les coupes on enlève le papier et on fixe le morceau, avec la solution forte, sur du bois ou du liège, après avoir amolli la couche de celloïdine la plus superficielle par un séjour de 5 minutes dans l'alcool absolu. Les pièces ainsi incluses seront conservées dans de l'alcool à 70°.

III. *Préparation et collage des coupes.*

Imprégnés de paraffine ou de celloïdine, les fragments de tissus ou d'organes doivent être débités en coupes à l'aide des microtomes. Les appareils perfectionnés (que nous avons seuls en vue) présentent tous

un dispositif qui permet de surélever la pièce juste à la hauteur correspondant à l'épaisseur de coupe que l'on veut obtenir. Tantôt le rasoir reste immobile et la pièce est amenée périodiquement devant lui par le jeu d'une vis (microtome Minot, fig. 108) ou par un mouvement de bascule (microtome de Cambridge, dit Rocking, fig. 109), tantôt le rasoir se meut dans un plan horizontal, toujours le même, et la pièce le long d'un plan incliné qui l'élève progressivement (microtomes dits à chariot, dont les plus connus sont ceux de Jung, de Schanze et de

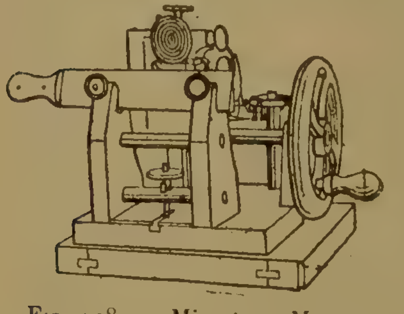


Fig. 108. — Microtome Minot.

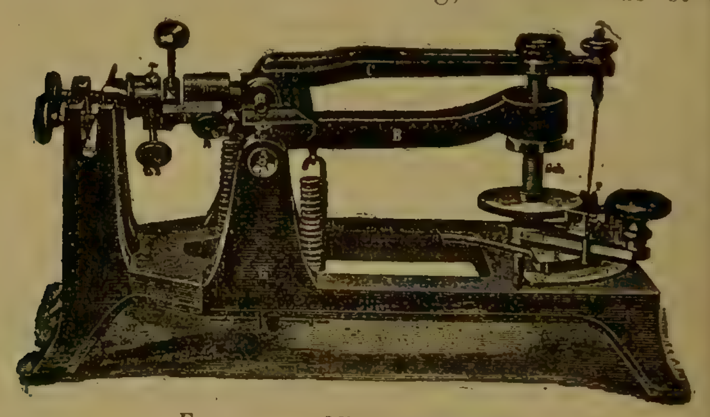


Fig. 109. — Microtome Rocking.

Reichert) (fig. 110). Tous ces modèles conviennent pour les pièces à la paraffine. Pour les pièces à la celloïdine, les microtomes à chariot sont seuls utilisables. Dans tous les cas il est indispensable de posséder d'excellents rasoirs; mais ceux-ci ne doivent jamais servir à sectionner des tranches épaisses. Si l'on veut éliminer une partie de la pièce incluse,

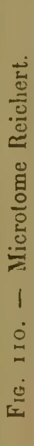


Fig. 110. — Microtome Reichert.

pour obtenir des coupes des régions moyennes, on se servira donc d'un scalpel ordinaire. Après chaque opération on devra affiler les rasoirs sur un bon cuir.

Pour débiter au microtome une pièce incluse dans la paraffine, on découpe, dans le bloc où le fragment a été inclus, un petit cube contenant ce fragment à son centre et on le colle sur le porte-pièce du microtome (Minot, Rocking) ou bien sur un bouchon ou un cylindre de bois (modèles à chariot). Cette dernière opération devient naturellement inutile quand on a fait l'inclusion sur bouchon (*ubi suprà*).

On égalise la surface de la paraffine et on fait les coupes le plus minces possible (au 200e de millimètre au moins). Toutes ces coupes restent adhérentes sous forme d'un ruban, grâce à la paraffine qui les entoure. On sectionne de place en place ce ruban en prélevant une ou plusieurs coupes, suivant la quantité qu'on désire coller sur chaque lame. Le collage est presque indispensable pour garantir les coupes de tout accident pendant la coloration. Il se pratique de la façon suivante. On étale en couche très mince à les surface des porte-objets une gouttelette d'albumine-glycérine de Mayer :

Albumine. . . .	} *ãã* 10 grammes.
Glycérine. . . .	
Thymol.	1 cristal (pour conservation).

On fait flotter les coupes à leur sortie du microtome sur de l'eau légèrement chauffée, de façon qu'elles s'étalent bien lorsque la paraffine commence à se ramollir. On glisse alors sous elles une languette de papier de soie, on les recueille et on les « décalque » pour ainsi dire à la surface des lames recouvertes du mélange albumineux. On enlève au papier de soie l'excès d'eau qui les entoure. On chauffe un peu, pour permettre à la coupe de s'étaler définitivement. On laisse sécher une nuit, autant que possible à l'étuve à 37°,

pour que l'adhérence soit parfaite. Si l'on est pressé, on peut sécher les coupes rapidement en appliquant à leur surface une feuille de papier de soie, mais on s'expose ainsi à les détacher, ou tout au moins à les souiller avec les fibres du papier.

On débarrassera les coupes de la paraffine, en les plongeant pendant quelques instants dans du xylol. Elles devront ensuite être traitées par l'alcool absolu, pour enlever toute trace de xylol.

Les objets inclus dans la celloïdine se coupent à l'état humide, c'est-à-dire qu'ils demandent, ainsi que le rasoir, à être humectés chaque fois avec un pinceau trempé dans l'alcool à 70° Les coupes seront étendues à plat sur une lame bien propre et disposées en séries, après quoi on les exposera aux vapeurs d'éther. Elles se collent alors solidement et sont en état d'être traitées par les réactifs colorants.

CHAPITRE XIV

EXAMEN A L'ÉTAT FRAIS SANS COLORATION

I. *Généralités.*

L'examen à l'état frais, sans coloration, a fait faire à la bactériologie ses premières découvertes ; aujourd'hui encore, il a ses indications bien déterminées et on devra se familiariser avec lui. On sait que les organismes des fermentations (Pasteur), la bactéridie charbonneuse (Rayer et Davaine; Pollender), le spirille de la fièvre récurrente (Obermeïer), le bacille de la fièvre typhoïde (Eberth), le parasite de la malaria (Laveran), les champignons des teignes (Bazin et Grüby) ont été découverts sans le secours des matières colorantes. On conçoit, d'autre part, que l'examen sans coloration puisse seul renseigner sur la forme exacte et sur la mobilité des bactéries, puisque, seul, il permet de les voir vivantes, sans les modifications que produit la fixation. Il rendra aussi de grands services pour l'étude des moisissures, des levures et des parasites animaux.

Avant d'envisager les différents cas qui peuvent se présenter, nous rappellerons que pour l'examen des préparations non colorées on emploiera de préférence les objectifs à sec (avec miroir concave et sans condensateur). Si on désire se servir de l'objectif à immersion (avec miroir plan et condensateur), on rétrécira le plus possible l'ouverture du diaphragme-

iris ; il importe en effet de ne pas noyer l'image dans une lumière trop intense. La difficulté principale de l'étude sans coloration réside dans ce fait que les microbes (et plus spécialement les bactéries), ont un indice de réfraction voisin de celui des milieux qui les contiennent. Comme, d'autre part, ils sont incolores et transparents, on conçoit que leur recherche soit parfois peu aisée. Ces difficultés sont surtout marquées lorsqu'il s'agit de rares individus et particulièrement lorsque leurs dimensions sont minimes ou qu'ils sont entremêlés de divers éléments des tissus animaux.

II. *Technique.*

Nous distinguerons quatre variantes dans l'examen à l'état frais.

1° **Examen entre lame et lamelle.**

Supposons qu'il s'agisse d'une culture ; deux cas peuvent se présenter suivant qu'elle a été faite en milieu liquide ou sur milieu solide. Si la culture est liquide, il suffit d'en prélever une trace avec la pipette Pasteur ou l'anse de platine et de la déposer sur une lame de verre bien propre. On recouvre avec une lamelle, en évitant l'introduction de bulles d'air. Si la culture s'est développée sur milieu solide, on dépose sur une lame une goutte d'eau de conduite (il faut se souvenir que l'eau distillée est bactéricide), de solution physiologique ou encore de bouillon, puis, avec un fil de platine, on prélève une légère trace de la culture et, avec ce même fil, on la délaie dans la goutte d'eau ; on applique enfin la lamelle comme dans le cas précédent. Il faut éviter avec soin de prélever un excès de culture, ce qui serait de nature à gêner considérablement l'observation. Pour

cela, nous recommandons de dissocier le dépôt microbien dans un verre de montre rempli de liquide et de prendre ensuite une ou deux gouttes du mélange. C'est d'ailleurs là une manipulation initiale à laquelle on aura utilement recours dans bien des cas, pour les préparations destinées à être colorées.

Quand on étudie les mouvements des aérobies, on examine surtout la périphérie de la préparation ; quand ils s'agit des anaérobies, on cherche, au contraire, exclusivement au centre de celle-ci.

Si l'examen doit se prolonger un peu on lute les bords de la préparation à la paraffine, ce qui présente le double avantage de s'opposer à l'évaporation et d'empêcher tout déplacement de la lamelle. Pour luter, il suffit, après avoir enlevé au papier de soie l'excès de liquide qui déborde le couvre-objet, de liquéfier un morceau de paraffine au contact d'une tige de fer chaude et de faire couler, à l'aide de cette même tige, la paraffine liquéfiée le long des bords de la lamelle, de façon à la border exactement.

Les préparations lutées suffisent pour certaines études qui demandent assez peu de temps (étude du bourgeonnement des levûres, du mouvement des corps flagellés des hématozoaires, etc.). Elles sont plus simples que les préparations dont nous allons parler maintenant, mais inférieures à elles.

2° Examen en chambre humide.

Chambre humide de Ranvier. — C'est une lame épaisse, qui présente à son centre une rigole circulaire limitant une zone un peu surbaissée. Sur cette dernière on place la goutte à étudier et on recouvre d'une lamelle qui l'étale en couche mince. La lamelle est maintenue adhérente au porte-objet à l'aide d'un peu de vaseline. La rigole circulaire emmagasine une

provision d'air indispensable dans certains cas (observation prolongée des mouvements des leucocytes chez les animaux à sang froid ; observation des microbes aérobies).

Cellules diverses, permettant de faire des gouttes suspendues. — *Cellule de Koch.* — Elle consiste dans un porte-objet creusé en son milieu. On dépose une goutte de liquide au centre d'une lamelle et on renverse sur la cellule. Il faut éviter que la goutte ne vienne au contact de la cavité du porte-objet, sinon elle s'étale immédiatement. Nous recommandons d'employer des lamelles propres mais, autant que possible, non flambées, car le flambage facilite l'étalement du liquide. La lamelle sera lutée, comme précédemment, avec de la vaseline.

Cellule de Böttcher. — Elle se réduit à un anneau de verre, aux bords bien dressés, que l'on fixe à la vaseline sur un porte-objet ordinaire. Sur l'anneau on dispose la lamelle qui porte la goutte suspendue. La cellule de Böttcher est d'un maniement plus commode que celle de Koch, mais l'examen ne peut se faire ici qu'avec des grossissements plus faibles, à cause de la hauteur de l'anneau.

On cultivera aisément les microbes en goutte pendante, à l'aide de l'appareil de Böttcher. Pour cela, il suffit de stériliser lame, anneau et lamelle à la flamme et de placer un peu d'eau au fond de la cellule, afin d'éviter l'évaporation, ce qui n'empêchera pas de disposer ultérieurement le tout dans la chambre humide à étagères de Malassez. Les cultures peuvent se faire en liquides ou en milieux solidifiables (gélatine, gélose).

Pour étudier les anaérobies à l'état vivant, Pasteur avait jadis fait construire par Geissler une ampoule plate munie de deux tubes effilés et susceptible d'être

placée sur la platine du microscope. Pour cultiver les mêmes organismes en chambre humide, M. Nikiforoff a imaginé une cellule analogue à celle de Ranvier et munie d'une rigole dans laquelle on peut introduire la solution alcaline de pyrogallol.

3° Examen à l'aide de la platine chauffante.

Lorsqu'on veut suivre pendant longtemps les mou-

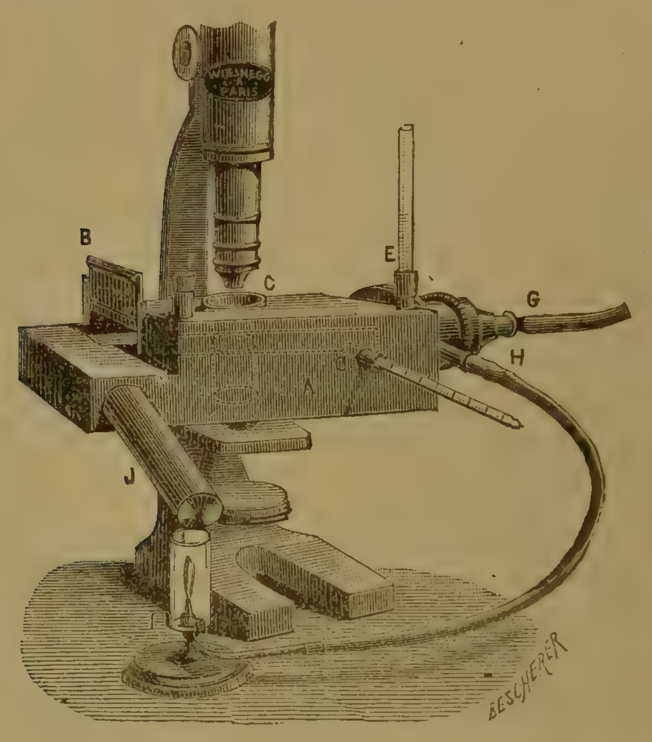


Fig. 111. — Platine chauffante de Vignal.

vements des leucocytes des animaux à sang chaud, étudier la phagocytose *in vitro* (Bordet) ou encore cultiver les microbes en goutte pendante, il suffit de placer les cellules précédentes dans une étuve. C'est

le moyen le plus simple et le plus employé. Mais, parfois, il est indispensable de ne pas imprimer le moindre mouvement à la préparation, afin d'assister aux modifications successives d'un élément ou d'un

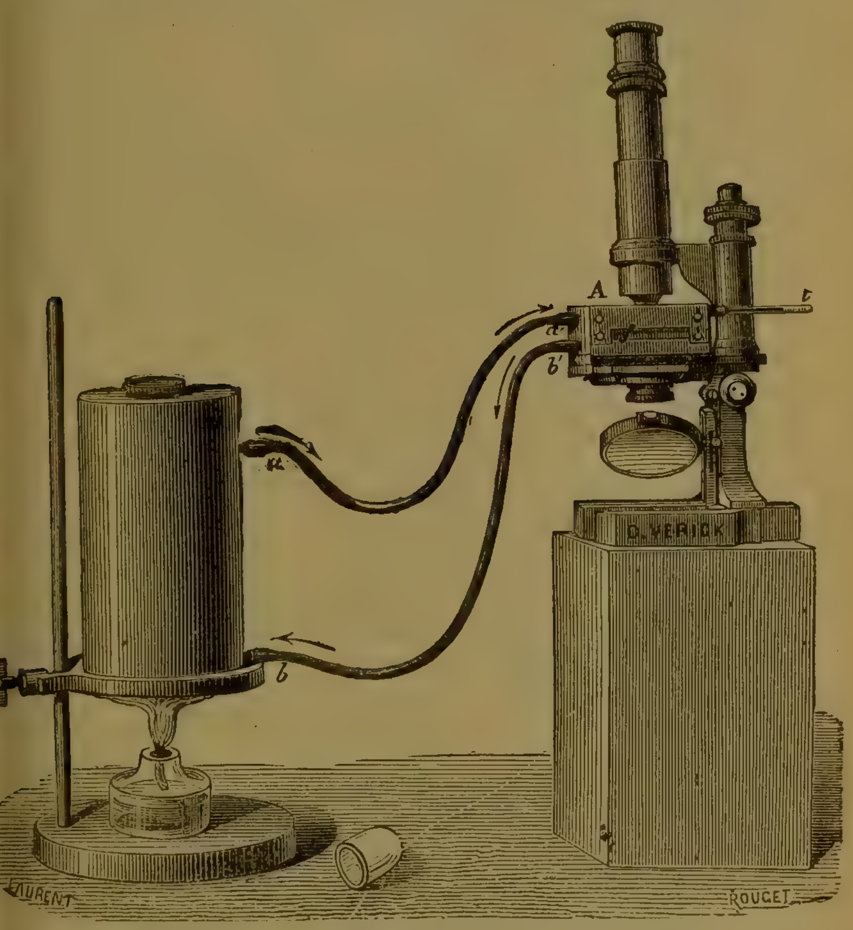


Fig. 112. — Platine chauffante de Ranvier.

groupe d'éléments situés dans le champ microscopique. On s'adresse alors aux *platines chauffantes*. Les plus connues sont celles *de Vignal* (fig. 111) et *de Ranvier* (fig. 112) ; leur maniement très facile

n'a pas besoin d'être décrit. Plus simple et plus économique est l'*appareil de Schultze*. C'est une plaque de laiton, percée en son milieu d'une ouverture correspondant au trou de la platine du microscope. Tout près de cette ouverture, se trouve un thermomètre qui permet de lire constamment la température de la plaque, et par suite celle de l'objet qu'elle supporte. La table de laiton se prolonge latéralement en deux bras, sous lesquels ont peut établir des brûleurs. Enfin, nous recommanderons comme très pratique l'*appareil de Pfeiffer*. Il consiste en une petite boîte de verre rectangulaire que l'on remplit d'eau. Deux tubes la font communiquer avec un réservoir d'eau chaude. Un thermomètre donne la température de la boîte, dont la face supérieure, creuse, joue le même rôle que la cavité de la cellule de Koch.

4° Examen après addition d'acides ou d'alcalis.

Lorsqu'on recherchera les microbes à l'état frais dans des pulpes d'organes (circonstance bien rare d'ailleurs) on « éclaircira » la préparation à l'aide d'acides ou d'alcalis dilués, qui dissolvent nombre d'éléments anatomiques, mais respectent la plupart des micro-organismes. C'est ainsi que procéda Eberth pour découvrir le bacille typhique dans la rate et les ganglions mésentériques. On fait encore couramment usage des alcalis pour l'examen des grains actinomycosiques dans le pus et pour l'étude des moisissures, dont nous allons dire quelques mots. Les moisissures s'examinent ordinairement dans la glycérine. Sur une lame propre, on dépose une goutte d'alcool ammoniacal (alcool à 95°, additionné d'un sixième d'ammoniaque), lequel jouit de la propriété de mouiller le mycélium et les spores. On saisit un fragment de moisissure avec une pince fine et

on le dépose dans l'alcool. On dissocie les filaments avec des aiguilles montées, pour obtenir une préparation nette et d'épaisseur uniforme. On met une goutte de glycérine et on recouvre d'une lamelle en évitant les bulles d'air. Avec du papier de soie, on enlève l'excès de liquide qui déborde la lamelle et on lute à la paraffine. On examine à sec. Notons, en passant, que pour bien étudier la disposition des spores, on choisit souvent des fructifications encore peu avancées, où les conidies non encore mûres ne risquent pas de se détacher trop aisément. On évitera avec soin d'écraser la préparation ; d'où l'emploi fréquent de deux petites bandes de carton mince placées entre la lame et la lamelle le long de deux bords parallèles de celle-ci.

Entre l'examen à l'état frais et les méthodes de coloration, la transition est ménagée par un procédé mixte qui permet d'étudier les microbes vivants (en mouvement même, si l'espèce est mobile) et légèrement teintés. Sur une lame de verre, on dépose une gouttelette d'un liquide colorant très étendu. On y mélange une trace de la culture à examiner. On recouvre d'une lamelle et on examine à sec ou à immersion. D'après M. Strauss, ce procédé suffirait à colorer les cils du vibrion cholérique (*ubi infra*).

III. *Indications de l'examen à l'état frais.*

Appliqué à l'étude des cultures il permet, avons-nous déjà dit, de se renseigner exactement sur le volume et la forme des microbes, sur leurs mouvements et sur leur mode de multiplication.

Appliqué à l'étude des produits pathologiques, notamment du sang et du pus, il rendra aussi des services. Il arrive souvent qu'on veut savoir si un liquide quelconque, une urine par exemple, ren-

ferme du sang. Une goutte du dépôt formé dans un verre conique ou mieux du liquide centrifugé est mise entre lame et lamelle et regardée au microscope. La constatation des globules rouges permet de distinguer immédiatement une hématurie d'une hémoglobinurie, ou d'une pseudohematurie quelconque. L'examen sans coloration suffit de même, dans certains cas, au diagnostic des parasites animaux du liquide sanguin. Sans parler des filaires, nous citerons les trypanosomes (dourine, surra, nagana) et les hématozoaires (paludisme, fièvre du Texas). On peut même dire que, dans bien des cas, les préparations à l'état frais sont plus instructives que les préparations colorées (étude des mouvements amiboïdes ou flagellés des protozoaires). Pour l'examen des bactéries, les renseignements sont d'ordinaire moins satisfaisants, surtout lorsque le microbe est de petite taille ou immobile. Au contraire lorsque l'organisme dont on recherche la présence est assez volumineux (b. anthracis), très mobile (spirille d'Obermeïer) ou qu'il offre quelque attribut caractéristique (bactéries encapsulées, telles que le pneumocoque ou le pneumobacille) on pourra parfois trouver avantage à se passer des colorations.

L'examen à l'état frais convient aussi à l'étude du pus. Il permet de s'assurer si un liquide donné contient des globules purulents et parfois en même temps de reconnaître le corps du délit. Il est tout à fait de mise dans la recherche des parasites animaux (amibes des abcès hépatiques).

Mentionnons pour terminer, l'examen sans coloration des pulpes d'organes (coccidiose), des selles (œufs de nématodes), etc., et concluons qu'en microbiologie l'étude à l'état frais est plus indiquée pour les protozoaires que pour les protophytes et pour les moisissures et levûres que pour les bactéries.

CHAPITRE XV

MATIÈRES COLORANTES

Pour voir les microbes sûrement et facilement, il est nécessaire de les colorer. Déjà très utile lorsqu'il s'agit du microbe lui-même, la coloration devient indispensable lorsqu'on veut étudier les spores, les capsules, les cils, etc. Il faut aussi colorer les microbes pour les distinguer des tissus, pour étudier leurs rapports avec les cellules phagocytaires, enfin pour les diagnostiquer les uns des autres. L'étude des colorations microbiennes comprend la connaissance des matières colorantes, des corps susceptibles d'exalter leur pouvoir tinctorial et des agents de différenciation et de décoloration. Nous étudierons successivement ces divers composés, puis nous donnerons quelques formules suffisantes pour les besoins ordinaires.

I. *Matières colorantes.*

Les matières colorantes usitées en microbiologie appartiennent à deux groupes : les *couleurs artificielles,* dites d'aniline et les *couleurs naturelles.*

Les premières se subdivisent elles-mêmes en deux classes : les couleurs acides et les couleurs basiques (Ehrlich).

Les *couleurs basiques* constituent de véritables sels, dans lesquels le principe colorant est représenté par la base, l'acide étant indifférent. Elles sont préci-

pitées par le réactif de Weingärtner (eau 100 grammes, tanin 10 grammes, acétate de soude 10 grammes) et par le picrate d'ammoniaque (Seyewetz). Elles présentent une affinité caractéristique pour les noyaux de presque toutes les cellules. Les bactéries, presque entièrement constituées (selon la plupart des auteurs) par un volumineux noyau, se comportent comme les noyaux cellulaires ; aussi est-ce avec les couleurs basiques qu'on les colorera. Les dérivés qu'utilise la technique bactériologique sont nombreux. Nous citerons : la fuchsine et le rouge Magenta ; divers violets de pararosaniline, parmi lesquels le violet de cristal et le violet de gentiane ; plusieurs colorants thioniques, tels que la thionine, le bleu de méthylène et le bleu polychromatique de Unna ; les safranines, à l'eau et à l'alcool ; le rouge neutre ; le brun de Bismark, etc. L'usage de tous ces colorants est superflu. Après de nombreuses recherches sur le sujet, nous avons cru pouvoir nous limiter, *pour la plupart des manipulations courantes,* à cinq substances : la fuchsine, le violet de gentiane (violet méthyl-benzylé, mélangé d'un peu de dextrine, composé mal défini mais excellent cependant), le bleu de méthylène, le bleu polychromatique et la thionine. Au point de vue pratique, ces cinq colorants peuvent se répartir en deux groupes : ceux qui surcolorent (fuchsine, violet de gentiane) et ceux qui ne surcolorent pas (bleu de méthylène, bleu polychromatique, thionine). Les matières colorantes du second groupe peuvent être employées pour teindre directement les microbes, non seulement lorsque ceux-ci se présentent isolés (cultures, liquides en fermentation, etc.), mais encore lorsqu'ils sont contenus dans les humeurs ou les tissus (sang, pus, coupes d'organes, par exemple). Avec les matières colorantes du premier groupe, au contraire, on ne

peut colorer directement que les bactéries isolées ; dans tout autre cas, la coloration, forcément excessive, doit être suivie, comme nous le verrons, de deux autres opérations : la différenciation et la décoloration. C'est la méthode indirecte, qui trouve ses indications comme le procédé direct les siennes.

Les *couleurs acides* d'aniline sont des sels où le principe colorant est représenté par l'acide, l'alcali étant indifférent. Elles précipitent par l'auramine (Seyewetz) mais non par le réactif de Weingärtner. Elles donnent avec les couleurs basiques des composés dits *neutres*, que nous retrouverons plus tard. En bactériologie, elles sont réservées à la coloration des humeurs et des tissus, à la coloration de ce qu'on appelle « le fond » des préparations. Les principales sont : les éosines à l'eau et à l'alcool, l'acide picrique, l'aurantia, etc. Parmi les colorants acides, les uns ont une affinité spéciale pour le protoplasma ; les autres teignent l'ensemble des préparations d'une manière diffuse. L'éosine à l'alcool et l'acide picrique (auxquels nous nous limiterons exclusivement) constituent des types de colorants diffus.

Les couleurs naturelles, le carmin, l'hématoxyline et son dérivé l'hématéine, sont réservées, elles aussi, à la coloration des tissus. Certains auteurs ont préconisé d'autres colorants naturels : le carmin d'indigo, l'orseille et l'orcéine par exemple.

II. *Substances susceptibles d'exalter le pouvoir colorant.*

Un grand nombre de corps exaltent le pouvoir colorant (des dérivés basiques d'aniline). Supposant qu'ils jouissent de la propriété de combiner la matière colorante et la substance à colorer, de façon à

les unir intimement l'une à l'autre, la plupart des auteurs les désignent sous le nom de « mordants ». Le nom et l'explication sont également impropres. Comment agissent ces substances ? Est-ce en se combinant véritablement aux couleurs pour former un nouveau composé plus énergique, ou en concentrant pour ainsi dire la solution et en lui donnant une tendance à la précipitation (Vorbereitung zur Ausfällung de Unna), ou encore en rendant la membrane des microbes plus perméable à la matière colorante ? On ne sait, mais il est probable que le mécanisme varie selon la substance employée. Quoi qu'il en soit, les unes sont neutres, comme le phénol ; les autres alcalines comme la potasse, le borate de soude, l'huile d'aniline. Nous employons exclusivement les solutions phéniquées, car elles sont aussi bonnes que les autres et se conservent infiniment mieux.

III. *Agents de différenciation et décolorants.*

Les principaux agents de différenciation qu'utilise la technique bactériologique sont : l'acide nitrique au quart, le chlorhydrate d'aniline à 1 pour 100, et la solution iodo-iodurée dite, liquide de Gram. Nous nous servons exclusivement d'un liquide « fort » dont voici la formule :

Iode.	1	gramme.
Iodure de potassium. . .	2	—
Eau.	200	—

Dissoudre l'iodure de potassium dans quelques centimètres cubes d'eau ; dissoudre l'iode dans cette solution concentrée d'iodure ; puis ajouter ensuite peu à peu le reste des 200 centimètres cubes d'eau. Dans le liquide de Gram « ordinaire », il y a 300 centimètres cubes d'eau.

Les principaux décolorants sont : divers acides, l'alcool, l'alcool-acétone, l'huile d'aniline, etc. Nous préférons à l'alcool absolu, pour la méthode de Gram (ubi infra), l'alcool-acétone qui décolore presque instantanément les tissus et ne maintient colorés que les microbes. Nous employons l'acétone mélangée à l'alcool absolu dans la proportion d'une partie pour 6 (préparations sur lames) ou d'une partie pour 3 (coupes).

IV. *Formules de solutions colorantes.*

Les matières colorantes dont nous avons donné l'énumération se trouvent dans le commerce sous forme de poudre ou de cristaux. Comment les transformer en solutions immédiatement applicables à la coloration des micro-organismes ?

La technique bactériologique se trouve littéralement encombrée d'un grand nombre de formules, imaginées par divers auteurs dont elles portent les noms. Il en résulte, particulièrement pour les débutants, une complication très sérieuse et en même temps bien inutile, car un petit nombre de recettes sont susceptibles de parer à tous les besoins. De même que nous avons considérablement réduit le nombre des colorant basiques vraiment indispensables en bactériologie, de même nous avons cru devoir simplifier la technique des solutions. Celle que nous donnons ici résulte d'une pratique personnelle déjà longue ; on trouvera d'ailleurs, soit dans le courant de cet ouvrage, soit dans le formulaire placé à la fin, l'indication d'autres solutions, préconisées par différents auteurs.

Avec les couleurs basiques (moins le bleu polychromatique, fourni en solution par la maison Grübler) et avec les deux couleurs acides (éosine à l'alcool et acide

picrique), on fera tout d'abord des *solutions mères.* Il suffit pour cela de dissoudre les colorants à saturation dans de l'alcool à 95° (violet de gentiane, fuchsine, bleu de méthylène, éosine à l'alcool, acide picrique) ou à 50° (thionine, peu soluble dans l'alcool fort).

Avec ces solutions mères, on prépare :

1° deux *solutions hydro-alcooliques* (fuchsine et bleu de méthylène) ainsi formulées :

Solution mère.	10 cent. cubes.
Eau distillée.	90 —

2° trois *solutions phéniquées* (fuchsine, violet de gentiane, thionine) également très simples :

Solution mère.	10 cent. cubes.
Eau phéniquée à 1 p. 100 . . .	90 —

3° une *solution alcoolique d'éosine* (éosine à l'allool), dite au 1/3.

Solution mère.	10 cent. cubes.
Alcool à 95°.	20 —

4° une *solution alcoolique* très étendue d'*acide picrique* (alcool à 95° additionné d'un peu de solution mère, de façon à obtenir la teinte de l'eau de chlore).

Le *bleu polychromatique* sera formulé comme il suit :

Bleu de Unna.	1 partie.
Eau phéniquée à 5 p. 100.. . . .	1 —
Eau distillée..	3 —

A ces recettes, nous joindrons une formule de carmin et une d'hématéine.

a) *Carmin* (formule de Orth).

Carmin.	2gr,50
Solut. saturée à froid de carbonate de lithine.	100 grammes.

b) *Hématéine* (formule de Mayer).

A.	Hématéine. . . .	1	gramme.
	Alcool..	10	cent. cubes.
B.	Alun ordinaire. . .	50	grammes.
	Eau.	1	litre.

Chauffer B jusqu'à dissolution de l'alun. Laisser refroidir. Mêler A et B. Filtrer.

Ces quelques formules suffisent d'ordinaire, comme nous l'avons dit, à la coloration des bactéries. Les différentes solutions doivent être filtrées aussitôt faites. Presque toujours, il sera nécessaire de les filtrer, une nouvelle fois, au moment de s'en servir.

On utilise, pour « éclaircir » les préparations, les essences de girofle ou de bergamote et le xylol ou le toluène. L'usage des essences est absolument inutile et même nuisible, car ce sont de puissants réducteurs qui décolorent toujours les préparations à la longue ; on se limitera donc au xylol ou au toluène. Pour monter les préparations on emploie la résine Dammar ou, plus souvent, le baume de Canada, dissous dans le xylol. Afin de limiter autant que possible les inconvénients dus aux propriétés réductrices du baume, on conseille de dissoudre celui-ci dans le chloroforme, de filtrer, de faire évaporer le chloroforme et de dissoudre dans le xylol le baume ainsi purifié.

CHAPITRE XVI

COLORATION SUR LAMES

I. *Dessiccation.* — *Fixation.*

Nous avons étudié précédemment la façon d'étaler un produit microbien à la surface d'une lame ou d'une lamelle. Nous n'y reviendrons pas. Les préparations, une fois faites, seront desséchées, à l'air libre, sous une cloche. Si l'on est pressé, on pourra activer l'évaporation en chauffant sur une flamme, mais toujours à une certaine distance de celle-ci (40 à 50 centimètres environ). Pour être sûr de ne pas atteindre une température trop élevée, on tiendra le couvre-objet ou le porte-objet entre ses doigts.

Une fois sèches, les lamelles ou lames seront fixées en versant à la surface de la couche étalée une ou deux gouttes d'un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther (Roux). On laissera évaporer avant de commencer la coloration. On peut aussi, comme cela se fait en Allemagne, fixer les préparations en les passant 3 fois dans la flamme ou en les plaçant pendant une minute sur une plaque chauffante (la plaque sera chauffée de telle sorte qu'une goutte d'eau, projetée à sa surface, ne reste sphérique qu'un instant très court, après quoi elle s'étale et s'évapore — Ehrlich). Ces deux modes de fixation empêchent le dépôt qui recouvre les lames ou lamelles de se détacher dans

les liquides colorants. Ils permettent en outre d'éviter les précipités que formeraient les matières colorantes avec les albuminoïdes non fixés. Ils donnent enfin aux éléments un état moléculaire tel qu'il facilite la coloration. Le chauffage, suivi de la fixation pendant une minute dans une solution aqueuse de sublimé à 3 pour 100, constitue une excellente méthode, à laquelle nous recourons volontiers. Il faut laver soigneusement à l'eau avant de colorer.

II. *Coloration.*

Nous distinguerons trois variétés de coloration : la coloration directe, qui renseigne uniquement sur l'existence des organismes, sans les différencier des tissus — la coloration de Gram, qui colore électivement certains microbes, en laissant les autres organismes et les éléments anatomiques incolores (M. Claudius a préconisé une autre méthode, qui donnerait les mêmes résultats) — et la méthode d'Ehrlich, qui permet d'obtenir une mise en évidence exclusive des bacilles tuberculeux et lépreux, avec décoloration des tissus et des autres bactéries.

1° **Méthode directe.**

A) Nous supposerons d'abord le *cas d'une culture* On peut recourir à deux procédés, suivant qu'on désire une coloration rapide, intense, un peu massive ou au contraire une coloration plus lente, plus modérée, plus délicate. Dans le premier cas, on emploiera le violet de gentiane phéniqué (préférable à la fuchsine phéniquée, ou liquide de Ziehl) et il suffira de faire agir le réactif pendant quelques secondes. Dans le second, on recourra à la solution hydro-alcoolique de bleu de méthylène, à la thionine phéniquée

ou au bleu polychrome phéniqué et on laissera agir quelques minutes. La coloration terminée, on enlève l'excès de matière colorante, en lavant la préparation avec le jet d'une pissette, sans faire tomber l'eau directement sur les parties teintées. On laisse sécher ; on met sur la préparation (nous supposons le cas d'une lame) une gouttelette d'huile de cèdre et on examine avec l'objectif à immersion. Si la préparation est bonne et mérite d'être conservée, on peut la monter dans le baume. A cet effet, après avoir enlevé l'huile de cèdre avec du xylol, on met sur les parties colorées une goutte de baume de Canada (dissous dans le xylol) et on recouvre d'une lamelle. On appuie légèrement sur la lamelle pour répartir uniformément le baume. Celui-ci sèche rapidement et la préparation devient ainsi permanente. On peut aussi se contenter d'enlever l'huile de cèdre avec quelques gouttes de xylol et conserver la préparation à nu. Ce procédé, que nous préférons, offre un avantage sérieux. La couche colorée se trouve soustraite à l'influence du baume qui jouit, avons-nous dit, de propriétés réductrices et finit toujours par détruire plus ou moins complètement les colorations.

Lorsqu'on désire se rendre un compte plus exact des dimensions et de la forme des bactéries, il est indiqué d'examiner la préparation dans l'eau. Après coloration et lavage, on enlève au papier de soie l'excès d'eau qui recouvre la lame, en laissant au-dessus des parties colorées la valeur d'une grosse goutte. Sur cette goutte, on place une lamelle. Après avoir de nouveau enlevé l'excès d'eau qui la déborde à l'aide du papier de soie, on place l'huile de cèdre sur la lamelle et on examine au microscope. Une telle préparation n'est pas, bien entendu, permanente.

Nous préférons de beaucoup l'examen sur lames que nous venons de décrire à l'examen sur lamelles.

Les lames coûtent moins cher, elles ne se cassent ni quand on les nettoie, ni au cours des diverses manipulations qu'exigent les colorations et elles permettent d'examiner une bien plus grande quantité de produit pathologique. Si on désirait néanmoins opérer sur lamelles, il faudrait avoir soin de tenir celles-ci à l'aide de la pince de Cornet, la face chargée regardant en haut. Après coloration, on lave, en faisant tomber le jet de la pissette sur la face nue, puis on renverse la face chargée sur un porte-objet. On enlève avec du papier de soie l'eau qui recouvre et déborde le couvre-objet ; on place sur lui une goutte d'huile de cèdre et on examine à immersion. Si la préparation doit être conservée, on enlève la lamelle, on essuie l'huile de cèdre avec du papier de soie ; on laisse sécher et on renverse finalement le couvre-objet sur une lame, à la surface de laquelle on a déposé une goutte de baume, dissous dans le xylol.

B) Bien qu'il ne différencie pas les bactéries, au point de vue couleur, le procédé de coloration directe n'en est pas moins applicable aux *examens des pulpes viscérales, du sang*..., etc.; il constitue d'ailleurs l'unique ressource quand on a affaire à des microbes qui ne prennent ni le Gram ni l'Ehrlich. Dans ce cas, il est indiqué de s'adresser aux solutions qui ne surcolorent pas; on évitera donc, en général, la fuchsine et le violet de gentiane. Nous allons citer deux exemples, pour fixer les idées. Supposons qu'on veuille étudier le pus d'un bubon, chez un malade atteint de peste. Le pus, étalé, séché et fixé suivant le procédé classique, sera coloré pendant environ 3 minutes par la thionine (on peut aussi employer le bleu de méthylène phéniqué ou le bleu de Unna), puis lavé, séché et examiné à immersion. On apercevra les bacilles de la peste courts, trapus, teintés en violet franc, le plus souvent à leurs seules extrémités (d'où

la forme dite en navette). Les cellules du pus apparaîtront également, avec leurs noyaux colorés en violet foncé et leur protoplasma teinté en violet clair ou incolore. Soit encore à examiner le sang d'un pigeon ayant succombé au choléra des poules. Le sang étalé, séché et fixé est coloré pendant une dizaine de secondes (la préparation étant ici très mince) par la thionine. Les parasites se présentent teintés en violet et offrant, encore ici, un aspect en navette. Les noyaux des globules blancs et des globules rouges (on sait que les globules rouges des oiseaux sont nucléés) ont également pris la couleur violette ; le corps des hématies n'est pas coloré. On obtiendrait des résultats à peu près identiques en employant, au lieu de la thionine, le bleu de méthylène phéniqué. La plupart des bleus ne colorent pas les globules rouges, quelques-uns les teintent en vert pomme ou en vert jaunâtre.

Si on voulait colorer à coup sûr les hématies, il faudrait recourir au bleu polychromatique, dont nous indiquerons le mode d'emploi à propos des hématozoaires, ou bien faire la *double coloration* éosine-thionine qui se pratique comme il suit. Colorer 10 secondes par l'éosine alcoolique au tiers ; laver à l'eau ; colorer 15 secondes par la thionine phéniquée ; laver, sécher, examiner. Dans l'exemple déjà cité (sang de pigeon mort du choléra des poules) on trouvera le corps des hématies et le protoplasma des leucocytes teintés en rose vif par l'éosine. La méthode éosine-thionine ne réussit guère qu'avec le sang, car elle exige des préparations d'une extrême minceur. On peut faire aussi des doubles colorations avec l'éosine et le bleu de méthylène (hydro-alcoolique).

2° **Méthode de Gram.**

Le principe de cette méthode est le suivant. La so-

lution iodo-iodurée, dont nous avons donné plus haut la formule, forme avec les couleurs basiques de pararosaniline, le violet de gentiane par exemple, un dérivé iodé qui possède une forte affinité pour certaines bactéries et une affinité très faible pour d'autres micro-organismes et pour les éléments des tissus. Un dissolvant, comme l'alcool acétone, ne décolorera donc pas les premiers et décolorera les seconds. La méthode permet ainsi de classer les microbes en deux groupes, suivant qu'ils restent ou non colorés, ou, comme l'on dit, suivant qu'ils prennent ou non le Gram.

Les *principaux microbes pathogènes qui prennent le Gram* sont les suivants :

La bactéridie charbonneuse.

Le vibrion septique.

Le bacille du charbon symptomatique.

Le bacille de Löffler.

Le bacille du tétanos.

Le pneumocoque.

Le staphylocoque.

Les streptocoques (pyogène, gourmeux, de la mammite des vaches).

Le bacille du rouget.

Le coccus de la mammite gangreneuse des brebis.

Les streptothricées de l'actinomycose, du farcin du bœuf, du pied de Madura, etc...

Les levures pathogènes.

Parmi les *microbes pathogènes qui ne prennent pas le Gram,* nous citerons :

Le bacille pyocyanique.

Le gonocoque.

Le strepto-bacille de Ducrey.

Le bacille de la pourriture d'hôpital.

Le bacille fusiforme de Vincent.

Les bacilles encapsulés.

Le bacille de la tuberculose zoogléïque.
Le bacille d'Eberth.
Le coli-bacille.
Les nombreux microbes du groupe coli-typhique.
Le bacille de la peste.
Le bacille de la morve.
Le bacille de Pfeiffer.
Le coccus melitensis.
Le spirille d'Obermeier.
Le vibrion du choléra et les vibrions similaires.
Le bacille du choléra des poules et toutes les pasteurella.

A) Soit à déterminer si (*en culture*) un microbe donné prend ou ne prend pas le Gram. C'est là un caractère diagnostique de première importance, qu'il ne faut jamais omettre de rechercher. On prépare une lame selon les procédés ordinaires et on la colore, au violet de gentiane phéniqué, 4 à 6 secondes. On rejette, sans laver, l'excès de matière colorante, et on traite par le liquide de Gram. La préparation prend immédiatement une teinte mordorée. On laisse en contact pendant 4 à 6 secondes, en renouvelant deux ou trois fois le réactif iodé. Puis on verse goutte à goutte de l'alcool acétone au 6e. Celui-ci s'écoule coloré en violet. On continue son emploi quelques secondes, jusqu'à ce qu'il devienne à peu près incolore. On lave et on examine dans l'eau. Si les microbes prennent le Gram, ils apparaissent teints en violet foncé, presque noir. Il peut se faire que la décoloration n'ait pas été poussée assez loin ; des organismes plus ou moins teintés subsistent alors en nombre variable. Il suffit de quelques gouttes d'alcool-acétone pour achever la décoloration. Si on désire garder la préparation, on la sèche ; puis on la conserve à nu, ou on la monte dans le baume.

B) Appliquée à l'*étude du sang, des pulpes d'organes*,

etc., la méthode de Gram permet de pratiquer sans difficulté des *doubles colorations*. Soit à étudier le pus d'un abcès à staphylocoques. On colore 4 à 6 secondes par le violet phéniqué. On fait agir, sans laver au préalable et pendant le même temps, le liquide de Gram. Puis on traite par l'alcool absolu additionné de 1/6 d'acétone jusqu'à ce que la préparation paraisse incolore ou à peine teintée en jaune. Si l'on regardait alors cette préparation, on n'apercevrait que les staphylocoques ; le reste demeurerait invisible. Faisons agir ensuite rapidement l'éosine alcoolique au tiers : nous colorerons en rose le fond de la préparation. Sur ce fond rose, les staphylocoques se détacheront en violet foncé, de façon, très nette. Au lieu d'employer de l'éosine à l'alcool, en solution alcoolique, après le Gram, on peut incorporer de l'éosine à l'eau au liquide iodo-ioduré. C'est le *procédé de Mérieux*. Après avoir coloré au violet phéniqué, on fait agir le mélange pendant 4 à 6 secondes, puis on décolore par l'alcool acétone au sixième. Voici la formule du liquide de Mérieux, dont nous recommandons vivement l'emploi.

Iode..	1 gramme.
Iodure de potassium..	2 —
Solut. saturée d'éosine (à l'eau) dans l'alcool à 95°.	20 cent. cubes.
Eau distillée.	200 —

Pour étudier le sang infecté (sang de cobaye mort du charbon par exemple), on procède comme pour l'examen du pus. Les hématies et le protoplasma des leucocytes sont alors teintés en rose, tandis que la bactéridie offre un ton violet foncé.

Lorsque deux bactéries coexistent dans un produit pathologique et que l'une d'elles seulement prend le Gram, on peut les distinguer aisément au moyen de la double coloration, pratiquée comme il suit. Suppo-

sons le cas d'un pus urétral, dans lequel se rencontrent à la fois deux micrococques, l'un décolorable par le Gram, le gonocoque ; l'autre colorable, le staphylocoque. On commence par faire un Gram selon le procédé ordinaire puis, après action de l'alcool-acétone et lavage à l'eau, on traite une demi-minute environ par la solution hydro-alcoolique de fuchsine. On lave, on sèche et on examine à immersion. Le fond de la préparation est coloré en rouge clair ; les staphylocoques, qui prennent le Gram, apparaissent en violet foncé; les gonocoques, qui se décolorent par le Gram et se recolorent par la fuchsine, offrent un ton rouge foncé. Dans le cas présent, la fuchsine a été substituée à l'éosine, car cette dernière, en tant que colorant acide, ne manifeste aucune affinité pour les bactéries. La solution hydro-alcoolique de fuchsine a été préférée à la fuchsine phéniquée en raison de son pouvoir colorant modéré. Il fallait prendre garde en effet de ne pas altérer la coloration primitive des staphylocoques. Les doubles colorations peuvent être variées dans de très larges limites à l'aide des différentes couleurs soit basiques, soit acides dont nous avons donné la liste.

C) Nous devons faire suivre la description de la méthode de Gram de quelques *remarques*. 1° D'après M. Unna, seuls les dérivés basiques de la pararosaniline (violets divers, bleu Victoria..., etc.,) permettent de réussir le procédé. Cette opinion, contestée par M. Neisser, paraît cependant bien conforme à la réalité des faits. 2° La décoloration est le temps délicat de la méthode. Si on ne décolore pas assez, on peut maintenir colorées des bactéries qui cependant ne prennent pas le Gram. Inversement, en insistant trop sur l'alcool-acétone, on arrivera à décolorer les bactéries les plus résistantes. Avec un peu d'habitude, on acquiert rapidement le tour de main nécessaire

pour mener à bien la préparation. 3° Le bacille tuberculeux et celui de la lèpre se colorent par la méthode de Gram, mais d'une façon discontinue, « en pointillé », étant composés de parties alternatives, dont les unes prennent et dont les autres ne prennent pas le Gram. Les moisissures (l'aspergillus fumigatus par exemple) prennent le Gram, mais assez difficilement.

3° Méthode de Claudius.

La méthode de coloration préconisée par M. Claudius présenterait les avantages de la méthode de Gram et serait en outre d'une application plus facile, ce qui nous paraît contestable. On colore, pendant une minute, la préparation à l'aide du violet de gentiane phéniqué, on lave à l'eau, puis on fait agir pendant une minute la solution suivante :

Solution saturée d'acide picrique. . .	1 vol.
Eau distillée.	1 vol.

On enlève l'excès de solution avec du papier filtre. On décolore ensuite avec du chloroforme ou de l'essence de girofle, jusqu'à ce que le réactif ne se teinte plus en bleu. Comme on le voit, c'est l'acide picrique qui joue ici le rôle de différenciateur.

Les microbes qui prennent le Claudius sont les mêmes que ceux qui prennent le Gram, et inversement. D'après M. Claudius, le vibrion septique et le bacille du charbon symptomatique se coloreraient toujours par sa méthode, tandis qu'ils ne prendraient le Gram que d'une façon inconstante. Pour notre part, nous n'avons jamais éprouvé de difficultés à colorer ces microbes par le Gram.

4°. Méthode d'Ehrlich.

Ainsi que nous l'avons vu, les bacilles tuberculeux

et lépreux peuvent être colorés par la méthode de Gram, mais cette coloration n'a rien de caractéristique. Le procédé d'Ehrlich teinte au contraire avec élection ces micro-organismes, et, bien qu'il soit applicable à quelques autres bactéries, il n'en possède pas moins une haute valeur diagnostique. Ces microbes sont le bacille de la verruga (d'après M. Ch. Nicolle) ; le bacille du smegma ; différents bacilles isolés du lait et du beurre par MM. Pétri, Rabinowitch, Hormann et Morgenroth, etc. ; le Mistbacillus et les Gras-bacilli I et II de M. Möller, etc. Nous décrirons simplement ici le procédé primitif d'Ehrlich et la modification très pratique que lui a fait subir Kühne.

Soit un crachat tuberculeux, convenablement étalé et fixé à la surface d'une lame. On verse sur cette lame de la fuchsine phéniquée et on chauffe au-dessus d'une petite flamme jusqu'à production de vapeurs. On éloigne la lame un instant, puis on la ramène sur la flamme, pour l'en écarter lorsque de nouvelles vapeurs se montrent, et ainsi de suite pendant une minute environ. Au lieu de colorer à chaud on peut teinter à froid ; il faut alors attendre dix minutes, mais les préparations sont plus belles, d'après nous. Quoi qu'il en soit, la coloration terminée, on lave à l'eau et on verse sur la préparation un peu d'acide nitrique au quart qu'on laisse agir très peu de temps ; 3 à 4 secondes suffisent. Sous l'influence de l'acide, la coloration rouge foncé du dépôt est remplacée par une teinte jaune clair. On laisse tomber de l'alcool absolu sur la lame ; cet alcool fait réapparaître la couleur rouge primitive et se charge de fuchsine. On le renouvelle jusqu'à ce qu'il n'entraîne plus de matière colorante. La préparation doit avoir alors une teinte rose pâle. On lave à l'eau et on verse un peu de la solution hydro-alcoolique de bleu de méthylène. Elle

communique en quelques instants (une demi-minute environ) au fond de la préparation une teinte bleu clair. On lave une dernière fois, on sèche et on examine. Si la préparation contient des bacilles tuberculeux, ceux-ci apparaissent sur le fond bleu colorés en rouge brillant. On distingue parfaitement dans ce fond bleu les éléments anatomiques et les autres micro-organismes du crachat. La méthode d'Ehrlich est basée, on le voit, sur ce fait très simple que le bacille tuberculeux est plus difficile à colorer et à décolorer que les autres microbes et les éléments anatomiques. En d'autres termes, s'il prend plus difficilement la matière colorante, il l'abandonne plus difficilement aussi.

La méthode d'Ehrlich présente cet inconvénient que la décoloration à l'acide nitrique est délicate et hasardeuse. Lorsqu'on prolonge un peu trop son action, cet acide est susceptible en effet de décolorer le bacille de Koch lui-même. Un procédé beaucoup plus commode a été découvert par Kühne, mort avant de le publier, et vulgarisé en France par M. Borrel. Il est basé sur la différenciation par le chlorhydrate d'aniline à 1 pour 100. Après avoir coloré, comme précédemment, la lame à l'aide de la fuchsine de Ziehl, on fait agir le réactif pendant 3 ou 4 secondes. On le dirait sans influence sur la préparation, car celle-ci n'éprouve aucune modification apparente; mais dès qu'on vient à verser de l'alcool absolu, le dépôt étalé sur la lame se décolore pour ainsi dire instantanément. On lave à l'eau et on teinte le fond à l'aide de la solution hydro-alcoolique de bleu de méthylène (1/2 minute) comme dans le procédé primitif d'Ehrlich. Ce procédé a du reste été varié de bien des façons, et cela sans grand profit. Ajoutons, en terminant, que la résistance à la coloration et à la décoloration, qui caractérise le bacille

tuberculeux et les organismes voisins, est due à la teneur de ces microbes en substances cireuses, ainsi que l'ont établi de nombreux expérimentateurs. Ajoutons aussi que la streptothricée du farcin du bœuf prend le Kühne mais non l'Ehrlich, ainsi qu'un de nous l'a observé il y a déjà longtemps.

CHAPITRE XVII

COLORATION DES COUPES

La coloration des microbes dans les coupes de tissus et d'organes est très importante. C'est grâce à elle qu'on peut connaître le siège exact des organismes, leurs rapports avec les cellules phagocytaires et les lésions déterminées par l'infection. Les coupes se colorent par les trois méthodes déjà indiquées.

1° La méthode directe, applicable aux microbes qui ne prennent pas le Gram. Les préparations se trouvent teintées, il est vrai, de façon uniforme, mais les microbes tranchent sur les autres éléments par leur nuance plus foncée.

2° La méthode de Gram (et celle de Claudius).

3° La méthode d'Ehrlich.

I. *Méthode directe.*

La coupe ayant été débarrassée de la paraffine, par action successive du xylol et de l'alcool absolu, il suffit de faire agir une des couleurs de la série thionique (lesquelles ne surcolorent pas), de laver et de monter au baume. Soit à colorer des coupes d'organes de pigeon mort du choléra des poules, foie ou rate par exemple. On traitera la coupe pendant une à deux minutes, suivant son épaisseur, par la thionine phéniquée. On lavera à l'eau ; on déshydratera à

l'alcool absolu et on éclaircira à l'aide du xylol. S'il reste à ce moment des opacités dans la préparation, c'est que la déshydratation n'a pas été assez complète; on fait alors agir à nouveau l'alcool absolu. On dépose finalement à la surface de la coupe une goutte de baume dissous dans du xylol et on recouvre d'une lamelle. A côté des éléments du foie ou de la rate, colorés en violet plus ou moins foncé, on découvre de nombreux bacilles parfaitement teintés. Le xylol, avons-nous dit, éclaircit la coupe. En effet, après lavage, la préparation, quoique fort bien colorée, garde toujours une certaine opacité. On pourrait néanmoins l'examiner dans l'eau. Mais si, après déshydratation, on la traite par le xylol, elle acquiert une transparence parfaite, infiniment plus favorable à la recherche des bactéries. Comme l'a fait remarquer M. Koch, en matière de préparation colorée, l' « image de forme » doit céder le pas à l' « image de couleur ».

Au lieu de thionine, on pourrait employer le bleu de méthylène de la façon suivante, indiquée par l'un de nous. Les coupes sont colorées pendant quelques minutes; on lave à l'eau et on fait agir quelques secondes une solution aqueuse de tanin à 10 pour 100. Le tanin insolubilise la matière colorante au niveau des microbes et des tissus. On lave, on déshydrate à l'alcool absolu; on éclaircit au xylol et on monte au baume. L'avantage de la thionine sur le bleu de méthylène consiste dans son insolubilité presque absolue dans l'alcool, une fois qu'elle s'est fixée sur les microbes et les éléments anatomiques. Aussi ne nécessite-t-elle pas l'intervention du tanin. Au lieu de tanin, M. Garnier préfère employer le molybdate d'ammoniaque à 10 pour 100; de plus, il fait agir la solution iodo-iodurée avant le bleu de méthylène.

La méthode directe se prête mal aux *doubles colorations*; dans le procédé au tanin, on peut les

obtenir en incorporant au réactif fixateur une couleur acide quelconque. Mais l'opération reste un peu délicate et les résultats ne motivent pas le mal qu'on se donne.

La *méthode de Nissl,* d'un usage courant en neurologie, représente, somme toute, une coloration directe suivie d'une décoloration ménagée. Elle permet de rechercher les bactéries dans les centres nerveux et renseigne, en même temps, sur l'état des cellules nerveuses, dont elle teinte électivement la substance chromatophile. La technique est simple. Des fragments de tissu nerveux sont fixés par l'alcool, puis inclus dans la celloïdine. Les coupes sont colorées pendant quelques minutes par la solution hydro-alcoolique de bleu de méthylène, ou mieux par le bleu polychrome de Unna. On lave à l'eau et on différencie à l'aide du mélange suivant :

Huile de cajeput. . . .	40	grammes.
Xylol.	50	—
Créosote.	50	—
Alcool absolu.	160	—

On éclaircit au xylol et on monte au baume.

II. *Méthode de Gram.*

Elle s'emploie toujours sous la forme de double, ou mieux de triple coloration.

Double coloration. — La coupe étant prête, on fait le Gram comme à l'ordinaire, mais en se servant d'alcool acétone au tiers, car les coupes retiennent la matière colorante plus énergiquement que les produits étalés sur lames. Puis on lave et on teinte par une couleur acide, laquelle ne donne d'ailleurs qu'un fond diffus, d'où l'avantage du procédé suivant.

Triple coloration. — Elle utilise d'ordinaire le picrocarmin. Soit par exemple à colorer le streptoco-

que dans le foie d'un lapin inoculé avec ce microbe. Les coupes, passées au xylol, pour les débarrasser de la paraffine, puis à l'alcool absolu pour enlever le xylol, sont traitées tout d'abord par le carmin de Orth. Il est bon d'alcooliser celui-ci au 1/6, afin d'éviter le décollement des coupes, le colorant alcalin dissolvant plus ou moins complètement l'albumine. On laisse agir un quart d'heure, et on lave à l'eau. On colore ensuite au violet phéniqué (4 à 6 secondes) et on différencie par le liquide de Gram (4 à 6 secondes également, en renouvelant deux à trois fois). Puis on décolore par l'alcool-acétone au tiers, jusqu'à la réapparition de la couleur rose, due au carmin. On traite rapidement par l'alcool picriqué. On déshydrate à l'alcool absolu. On éclaircit au xylol et on monte dans le baume. L'examen au microscope permettra de voir les streptocoques teintés en violet foncé, les noyaux des cellules du foie en rose, et le protoplasma de ces mêmes cellules en jaune. Le carmin s'est donc localisé dans les noyaux, le violet dans les bactéries, l'acide picrique dans le protoplasma.

III. *Méthode de Claudius.*

La méthode de Claudius se prête, tout comme la méthode de Gram, à des doubles et à des triples colorations. On colorera, par exemple, pendant un quart d'heure avec le carmin de Orth. Après lavage à l'eau, on fera agir pendant 1-2 minutes le violet de gentiane phéniqué, puis, pendant 1-2 minutes également, la solution picriquée. On enlèvera avec soin la solution picriquée avec une feuille de papier de soie et on versera sur la coupe un peu de chloroforme. Absorber ensuite le chloroforme et le remplacer par une goutte d'essence de girofle. Recommencer ainsi

jusqu'à ce que la coupe ait pris une teinte rose. Éclairir au xylol et monter au baume.

IV. *Méthode d'Ehrlich.*

Cette méthode est exclusivement employée pour la coloration des bacilles de la tuberculose et de la lèpre. Il est facile d'obtenir des triples colorations (violet, carmin, acide picrique). Les procédés de coloration double donnent cependant de meilleures définitions. On pourra recourir à l'une des deux méthodes suivantes :

1° *Procédé de Ziehl (modifié).* — Colorer les coupes pendant 10 minutes à froid dans la fuchsine phéniquée, puis, après lavage à l'eau, faire agir rapidement l'acide nitrique au 1/3 et décolorer par l'alcool absolu. Les bacilles restent seuls teintés en rouge. Laver. Faire agir une demi-minute la solution hydro-alcoolique de bleu de méthylène. Laver. Insolubiliser au tanin à 1/10. Laver. Déshydrater à l'alcool absolu et monter au baume.

2° *Procédé de Kühne.* — Traiter la coupe pendant 2 minutes par l'hématéine, puis laver. Pratiquer le Kühne d'après le procédé habituel. Une fois montée au baume, la préparation montrera les bacilles de Koch teintés en rouge vif et les tissus en violet. L'hématéine s'est localisée sur les tissus (surtout sur les noyaux, le reste n'étant que faiblement, mais suffisamment teinté), et la fuchsine sur le bacille tuberculeux.

CHAPITRE XVIII

COLORATIONS SPÉCIALES (SPORES, CAPSULES, CILS, ACTINOMYCES, MICROBES DÉGÉNÉRÉS, PROTOZOAIRES ET LEURS NOYAUX, NOYAUX DES BACTÉRIES ET DES LEVURES)

I. *Coloration des spores.*

La grande réfringence des spores permet toujours de les voir sur une préparation à l'état frais. Elles apparaissent sous forme de corpuscules arrondis ou ovalaires, pourvus d'un éclat particulier. Elles ne sont pas justiciables des procédés ordinaires de coloration et se présentent comme des taches claires au milieu des bacilles colorés. La méthode qu'on emploie pour teindre les spores offre de grandes analogies avec celle qui est usitée pour la coloration du bacille de Koch. La raison est analogue ; les spores se colorent difficilement et elles sont également difficiles à décolorer, mais ici la cause intime réside dans l'épaisseur de leur membrane et surtout dans la condensation de leur protoplasma. Pour réaliser une double coloration, M. Neisser traite les préparations à chaud par la fuchsine de Ziehl, puis rapidement par l'acide sulfurique étendu ; les spores demeurent colorées en rouge. Il fait agir alors le bleu de méthylène aqueux, qui teint en bleu le corps du bacille dans lequel sont contenues les spores. M. Möller emploie un procédé que nous ne saurions trop recommander. On s'adresse de préférence aux cultures sur gélose, dont on fait des émulsions bien

homogènes. Celles-ci sont étalées sur lames, séchées et fixées à l'alcool-éther ou à l'alcool absolu. On traite ensuite pendant 3 minutes par une solution d'acide chromique à 5 pour 100, de manière à « mordancer » la paroi des spores. On lave à l'eau et on fait agir pendant une minute la fuchsine de Ziehl à chaud, mais sans atteindre l'ébullition (chauffages successifs). On lave à nouveau. Le corps du bacille est ensuite décoloré à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 5 pour 100 (10 secondes), puis recoloré avec la solution hydro-alcoolique de bleu de méthylène (une demi-minute). On lave, sèche et examine. Au microscope, les spores apparaissent teintées en rouge vif, les corps bacillaires en bleu.

Signalons, pour terminer, le procédé curieux de coloration indiqué par M. Buchner. Ce savant tue les les spores par la chaleur et les rend ainsi justiciables d'une coloration directe, mais en même temps, il fait perdre toute colorabilité aux bacilles ; sa méthode teinte donc exclusivement les formes de résistance. Les préparations sont portées une demi-heure à 210° (chaleur sèche) ou une heure à 120° (autoclave) et traitées ensuite par la fuchsine de Ziehl.

On sait qu'on ne doit pas confondre les spores avec les espaces clairs de certains micro-organismes (bactéries du genre pasteurella, bacille de la peste, bacille d'Éberth cultivé sur pomme de terre, etc.).

II. *Coloration des capsules.*

Sur lames. — Certains microbes, le pneumocoque par exemple, sont entourés d'une zone hyaline brillante déjà perceptible à l'état frais, mais qu'on met mieux en évidence à l'aide de procédés spéciaux de coloration. Pour voir nettement les capsules dans le sang du lapin mort de septicémie pneumococcique,

il suffit de colorer quatre à six secondes par le violet phéniqué, puis de traiter rapidement par l'alcool-acétone au tiers. On aperçoit les microbes teints en violet foncé et entourés d'un halo violet clair. On a proposé plusieurs autres méthodes. Ainsi, M. Roux conseille de colorer pendant quelques minutes dans la solution phéniquée de bleu de méthylène. Sans laver, on passe rapidement dans une solution aqueuse faible de violet de gentiane ; on lave à l'eau et on examine après dessiccation. Les microbes sont teints en bleu violacé, les capsules en violet clair. Un autre procédé consiste à traiter une minute par l'acide acétique à 1 pour 100, puis à sécher rapidement et à colorer par le violet de gentiane aniliné. La différenciation des microbes et des capsules est alors très nette (Friedländer). Enfin M. Ribbert incorpore l'acide acétique à la matière colorante. On fait agir sur la préparation la solution suivante :

Eau distillée.	100
Acide acétique.	12,5
Alcool absolu..	50
Violet Dahlia.	à saturation.

On colore très rapidement, on lave et on sèche. Ici, le réactif colorant, tempéré par un agent de décoloration, donne d'emblée une différenciation très nette. Les bactéries sont teintes en violet foncé et les capsules offrent une teinte plus pâle.

Dans les coupes. — Friedländer a recommandé jadis le procédé suivant, bien rarement employé il faut l'avouer. Faire agir pendant 24 heures, sur la coupe une solution ainsi formulée :

Fuchsine.	1	gramme.
Alcool absolu.	5	—
Acide acétique.	2	—
Eau distillée.	100	—

Laver à l'alcool, puis traiter pendant 2 minutes

par une solution d'acide acétique à 2 pour 100. Laver à l'eau distillée. Déshydrater par l'alcool absolu. Éclaircir dans le xylol et monter au baume.

II. *Coloration des cils.*

A) D'un façon générale, les cils des bactéries ne sont pas visibles à l'état frais et ne peuvent être aperçus davantage à l'aide des procédés ordinaires de coloration. On ne les met en évidence qu'en les photographiant (Neuhauss) ou en recourant à des procédés de teinture spéciaux. Notons cependant qu'on peut voir nettement, par l'examen direct, les flagella de quelques organismes volumineux (sulfobactéries). Notons aussi que Strauss est arrivé à colorer les cils à l'état vivant à l'aide d'une technique très simple, mais malheureusement applicable au seul vibrion cholérique. On prélève une goutte de culture jeune en bouillon et on la dépose sur une lame de verre. On y ajoute, en mélangeant bien, une goutte de fuchsine phéniquée, étendue de 4 parties d'eau. On recouvre d'une lamelle et on examine aussitôt avec l'objectif à immersion. Dans les cas heureux (la réussite est loin d'être fatale), on aperçoit, au milieu du liquide teinté en rose pâle, les vibrions plus colorés et animés d'un mouvement très vif. Si l'on fixe les microbes avec un peu d'attention, on distingue à l'une des extrémités un cil unique, mince, teinté assez faiblement ou plutôt accusé par des grains foncés disposés en chapelet. Ces grains semblent, d'ailleurs, fixés à la surface du flagellum et non contenus dans son intérieur. On dirait qu'en s'agitant au milieu du liquide, le flagellum a collecté de petits corpuscules colorés, ou bien de petits corpuscules incolores que la fuchsine a ensuite teintés. Au bout de 5 à 10 minutes, les vibrions deviennent immobiles ; ils sont morts et les flagella deviennent

beaucoup plus difficiles à voir, tandis que les microbes se colorent, au contraire, de plus en plus. Dans la presque totalité des cas, répétons-le, on ne peut teindre les cils qu'en s'adressant aux microbes morts et en faisant usage de méthodes particulières. M. Koch parvint le premier (1877) à mettre en évidence les flagella de plusieurs bactéries, en traitant les préparations sèches par l'extrait de bois de campêche, puis par le liquide de Müller. Quelques années plus tard, M. Neuhauss conseilla de faire agir pendant cinq minutes une bonne encre tannique (Kaisertinte) à chaud, puis, pendant un quart d'heure, une solution tiède et faible de chromate de soude. L'opération était recommencée 3 ou 4 fois jusqu'à obtention du résultat voulu.

B) Ces méthodes restaient très défectueuses et les premiers procédés pratiques de coloration datent en réalité des travaux de M. Löffler. Sa technique est la suivante. Diluer une parcelle de culture jeune sur gélose dans une quantité notable d'eau ordinaire. Moins il y aura de bactéries sur la lamelle et moins on aura à craindre les précipités. Il faut que les lamelles aient été préalablement lavées, puis bien flambées pour les débarrasser des matières grasses. Dans ces conditions, une goutte de dilution doit s'étaler d'elle-même à leur surface. La préparation, une fois faite, sera séchée à l'air et à l'abri des poussières, puis fixée dans la flamme. Tenant la lamelle avec une pince de Cornet on versera ensuite sur la couche microbienne une grosse goutte d'« encre de fuchsine » dont voici la formule :

Solution aqueuse de tanin à 20 pour 80. . .	10 cent. cubes.
Solution aqueuse de sulfate ferreux saturée à froid.	5 —
Solution saturée de fuchsine dans l'alcool absolu.	1 —

On chauffe pendant une demi à une minute au-dessus d'une petite flamme, jusqu'à émission de vapeurs. On lave à l'eau distillée, puis à l'alcool absolu. On colore ensuite pendant une minute à l'aide de la solution suivante, en chauffant avec précaution :

Eau saturée d'huile d'aniline.	100 cent. cubes.
Solution de soude à 1 pour 100.	1 —
Violet de gentiane ou fuchsine.	4 à 5 grammes.

On lave une dernière fois à l'eau ; on laisse sécher et on monte dans le baume.

L'encre de fuchsine, telle que nous l'avons formulée, doit être acidifiée ou alcalinisée plus ou moins, suivant l'espèce bactérienne à laquelle on a affaire. Pour cela, on l'additionne d'un nombre déterminé de gouttes de soude à 1 pour 100 ou d'acide sulfurique à 1,225 pour 100. Voici les nombres donnés par M. Löffler pour les principaux microbes flagellés :

Vibrion cholérique. . . .	1/2 à 1 goutte	(Sol. acide).
Bacille pyocyanique. . . .	5 à 6 gouttes	—
Micrococcus agilis.. . . .	19 à 20 gouttes	(Sol. alcaline).
Bactérium Chauvœi. . . .	1ème 2/3	—
Bacille typhique.	1 cent. cube	—
Bacillus subtilis.	28 à 30 gouttes	—
Vibrion septique.	36 à 38 gouttes	—
Bacille du lait bleu. . . .	de 20 gouttes de sol. acide à 15 gouttes de sol. alcaline.	

C) Cette méthode, bien qu'un peu compliquée, a fait faire de grands progrès à l'étude des cils. Le procédé suivant, indiqué, par l'un de nous, en collaboration avec le D[r] Morax, constitue une simplification de la méthode de Löffler. Il supprime notamment l'acidification ou l'alcalinisation, dont l'importance paraît avoir été exagérée et permet de voir très aisément les cils de la plupart des bactéries mobiles. Soit, par exemple, à colorer ceux du bacille typhique. Une dilution de culture sur milieu solide est étalée et

séchée sur une lame, qui sera tenue à la main pendant la série des manipulations. Pour faire agir l'encre de fuchsine, on en dépose une grosse goutte et on chauffe quelques minutes sur une petite flamme. Dès qu'apparaissent des vapeurs, on lave ; on recommence deux à trois fois l'opération (mordançage et lavage), puis on colore par la fuchsine phéniquée, en chauffant une ou deux fois pendant une quinzaine de secondes. On enlève l'excès du réactif par un lavage à l'eau ; et, après dessiccation, on monte, si l'on veut, dans le baume. Au microscope, les bacilles apparaissent entourés d'un véritable chevelu de cils, au nombre de 8 à 12 dans les « exemplaires complets ». Un certain nombre des flagella, très fragiles comme on sait, se trouvent toujours arrachés lors de l'étalement de la culture sur la lame. La figure ci-jointe schématise divers types de bactéries ciliées (fig. 113).



Fig. 113. — Divers types de bactéries ciliées.

D) Nous mentionnerons rapidement plusieurs méthodes basées sur le même principe que celle de Löffler, mais qui ne présentent à notre avis aucun avantage sur elle. M. Trenkmann (dans un de ses nombreux procédés) traite les préparations, pendant 6 à 12 heures, par le tanin à 2 pour 100, additionné d'un ou 2 millièmes d'HCl. Il fait agir ensuite l'eau iodée durant une heure et colore au violet de gentiane aniliné faible pendant 30 minutes. MM. Rémy et Sugg se servent de l'encre de Löffler, mais ils la font agir à froid pour éviter les précipités ; l'opération doit être prolongée pendant 15 à 30 minutes. On rejette le liquide et on le

remplace immédiatement par une goutte de solution de Gram. On lave à l'eau, puis à l'alcool absolu. On dépose enfin la lamelle dans un verre de montre rempli du colorant suivant :

Eau saturée d'huile d'aniline.	20 cent. cubes.
Sol. alcoolique de violet de gentiane.. . .	1 goutte.
Eau distillée.	5 cent. cubes.

Après une demi-heure de contact à 37°, on lave et on sèche. Un dernier procédé de coloration des cils, basé sur l'emploi des « mordants », est dû à M. Bunge. Cet auteur emploie le mélange suivant :

Solution aqueuse saturée de tanin. . . .	3 parties.
Solution de perchlorure de fer à 1/20. . .	1 —

A 10 centimètres cubes du liquide on ajoute 1 centimètre cube de solution aqueuse concentrée de fuchsine. Le « mordant » ainsi constitué ne doit être employé qu'après quelques semaines d'exposition à l'air libre, alors que sa coloration, de bleu violacé est devenue brun rougeâtre. Si on est pressé, on peut obtenir artificiellement la maturation de l'encre de Bunge en ajoutant goutte à goutte, à une solution datant de quelques jours, 3 pour 100 de son poids d'eau oxygénée. Mais, préparée de cette façon, la solution s'altère très rapidement. Quoi qu'il en soit, la préparation étant fixée, on fait tomber dessus quelques gouttes du « mordant » filtré. On laisse agir cinq minutes, après quoi on lave, on sèche et on colore à la fuchsine phéniquée, en chauffant légèrement. On lave une dernière fois et on sèche.

E) M. van Ermengem a imaginé, pour la mise en évidence des cils, une méthode très ingénieuse, mais qui constitue une « imprégnation » et non une coloration véritable. Il commence par plonger, la lamelle

(fixée par la chaleur), une demi-heure à froid ou 5 minutes à 60°, dans une encre ainsi composée :

Acide osmique à 2 p. 100.	1 partie.
Tanin à 20 p. 100. . .	2 —
Acide acétique.	IV ou V gouttes pour 100^{cmc} de sol.

On lave et on fait agir, pendant 5 à 10 secondes, une solution de nitrate d'argent à 0,5 pour 100 ; puis, sans laver, on plonge immédiatement dans le bain réducteur et renforçateur suivant :

Acide gallique.	5	grammes.
Tanin.	3	—
Acétate de soude fondu. .	10	—
Eau distillée.	350	—

Après quelques instants, on place à nouveau la lamelle dans la solution de nitrate d'argent. Il faut arrêter l'opération dès que le bain d'argent commence à noircir; on lave ensuite à grande eau. Si la coloration n'offre pas l'intensité voulue, on passe encore une fois dans le renforçateur, puis dans le nitrate. Finalement on lave, et après dessiccation à l'air libre, on monte, si l'on veut, dans le baume. Les résultats sont des plus satisfaisants.

On voit que, quelle que soit la méthode employée, on ne saurait mettre les cils en évidence sans les avoir « préparés » à l'aide de solutions tanniques. Nous disons « préparés » et non « mordancés », car il ne s'agit nullement ici d'un mordançage, au sens où l'entendent les teinturiers.

IV. *Coloration du streptothrix de l'actinomycose.*

Le streptothrix de l'actinomycose prend le Gram, mais les renflements claviformes qu'il présente dans les nodules typiques se décolorent constamment ; il

est vrai qu'on les reconnaît aisément à leur ton ambré. Si on désire les mettre en évidence de façon plus satisfaisante, on emploiera un des deux procédés suivants. Les coupes (il s'agit plus rarement de préparations sur lames) sont colorées pendant quelques minutes par la safranine anilinée, solution concentrée de « safranine à l'eau » dans l'eau saturée d'huile d'aniline. Sans laver, on fait agir le liquide de Gram. On décolore à l'alcool absolu et on monte au baume (Babès). On peut aussi (Weigert) traiter les préparations pendant une heure par le liquide obtenu en faisant dissoudre de l'orseille pure jusqu'à coloration rouge foncé dans :

Acide acétique.	5	cent. cubes.
Alcool absolu.	20	—
Eau distillée.	40	—

On lave à l'alcool et on colore pendant quelques minutes par le violet de gentiane (solution aqueuse à 1 pour 100) ou par le bleu de méthylène hydro-alcoolique. On monte au baume. Les renflements claviformes sont colorés en rouge, le mycélium en violet ou en bleu.

V. *Coloration des microbes dégénérés.*

Englobés dans les cellules phagocytaires, les microbes présentent plus ou moins rapidement des altérations dégénératives et se résolvent d'ordinaire en granulations. On peut mettre celles-ci en évidence dans les exsudats en employant la technique suivante. Les préparations, après dessiccation, sont fixées par l'acide picrique en solution aqueuse saturée (Bordet). Puis, on colore successivement par l'éosine alcoolique au tiers et par le bleu de méthylène hydro-alcoolique ou la thionine phéniquée, comme il a été

indiqué au chapitre de la coloration directe. Après lavage à l'eau et dessiccation, on monte *ad libitum* dans le baume. A l'examen microscopique, on trouvera, dans certains cas, que les organismes englobés sont devenus oxyphiles, en même temps qu'ils se réduisaient en grains. Ils prennent alors l'éosine au lieu du bleu ou de la thionine. Il faut savoir cependant que diverses bactéries se transforment en détritus granuleux tout en gardant jusqu'à la fin la propriété basophile (Bordet).

VI. *Coloration des protozoaires.*

Le procédé suivant permet de teinter assez facilement les amibes qu'on trouve dans l'intestin de l'homme sain ou atteint de dysenterie. Une goutte du liquide qui renferme ces parasites est déposée sur une lame et recouverte d'une lamelle. On fait pénétrer ensuite par capillarité une solution d'acide chromique à 1 pour 100. Afin d'y arriver, on verse le liquide près de l'un des bords du couvre-objet et on place, près du bord opposé, une petite languette de papier filtre. Les parasites étant ainsi fixés, on peut les colorer en faisant passer finalement sous la lamelle un peu de solution de carmin.

Les hématozoaires de l'homme ou des animaux sont facilement mis en évidence à l'aide du bleu de méthylène hydro-alcoolique ou de la thionine phéniquée, mais les résultats de beaucoup les plus satisfaisants sont ceux qu'on obtient avec le bleu polychromatique de Unna. Voici comment l'un de nous a coutume d'opérer. Le sang, étalé sur lame, est fixé sur la platine chauffante pendant une minute. Puis on fait agir, pendant une minute également, une solution aqueuse de sublimé à 3 pour 100. On lave et on colore une à deux minutes à l'aide du bleu de

Unna phéniqué ; on lave, on sèche et on examine au microscope. Les globules rouges sont colorés en vert pomme et les hématozoaires en violet. Les noyaux des leucocytes et leur protoplasma offrent des tons violets plus ou moins foncés. Enfin les granulations basophiles apparaissent teintées en rouge rubis. Nous préférons la méthode précédente au procédé éosine bleu de méthylène ou au procédé éosine-thionine, dans lesquels les globules rouges sont colorés en rose, les noyaux des leucocytes et les parasites en bleu ou en violet.

Quelques protozoaires (myxosporidies par exemple), jouissent de la propriété de se teindre en violet par l'iode. M. Vlacovitch conseille, pour colorer l'organisme de la pébrine, de faire agir pendant 48 heures une solution de potasse à 30 pour 100, puis de traiter par le liquide de Gram et d'examiner dans une goutte d'acide acétique cristallisable. Les parasites apparaissent en violet clair.

D'une façon générale, la méthode de Laveran, qui va être décrite, sera préférée à tous les autres modes de coloration des divers protozoaires.

VII. *Coloration des noyaux des protozoaires.*

Depuis le procédé initial de Romanowsky, de nombreuses méthodes ont été proposées. Nous indiquerons la meilleure, due à M. Laveran. Elle repose sur l'emploi d'un colorant spécial, obtenu en mélangeant ensemble : 4 centimètres cubes d'une solution à 1 pour 1 000 d'éosine à l'eau (de la fabrique de Höchst), 6 centimètres cubes d'eau distillée et 1 centimètre cube de bleu Borrel. Nous devons indiquer en détail la préparation de ce dernier colorant. On dissout quelques cristaux de nitrate d'argent dans 50 à 60 centimètres cubes d'eau distillée ; on ajoute

un excès de soude ; il se forme un précipité noir d'oxyde d'argent, qu'on lave soigneusement à l'eau distillée. Sur ce précipité, on verse une solution aqueuse saturée de bleu médicinal de Höchst (bleu de méthylène pur). On laisse en contact 7 à 8 jours, en agitant chaque jour. On filtre au moment de l'usage. On filtre d'autre part la solution d'éosine. On mélange les deux solutions et on ajoute l'eau distillée.

La préparation, séchée et fixée pendant 20 minutes à l'alcool absolu, est colorée plus ou moins longtemps, selon l'hématozoaire et même la partie de l'hématozoaire en jeu et la date du prélèvement du sang (il faut colorer d'autant plus longtemps que la préparation est plus ancienne). Pour une préparation fraîche de sang paludique, 5 à 10 minutes suffisent en général. Plusieurs heures (jusqu'à 12 heures même) sont nécessaires pour les hématozoaires des oiseaux, ainsi que pour les flagella. Quand on croit avoir réussi, on lave, on fait agir une minute le tanin à 5 pour 100, on lave à nouveau et on examine dans l'eau. S'il y a trop de précipités, on traite rapidement par l'alcool absolu. Finalement on sèche et monte. La grande difficulté ici, comme pour la coloration des cils, consiste à éviter les précipités. S'il s'agit d'une préparation sur lamelle, on fera flotter celle-ci sur le bain colorant. S'il s'agit d'une lame, on la disposera dans une boîte de Petri, de manière que la face chargée baigne dans la partie supérieure du liquide.

La méthode de Laveran et les procédés analogues permettent de colorer les noyaux des amibes (Feinberg) et des trypanosomes (Kempner et Rabinowitch). Dans ces procédés, le noyau se trouve mis en évidence par la couleur « neutre » que forment, en se combinant, le bleu de méthylène et l'éosine. Cette couleur est maintenue dissoute grâce à un excès de l'un des

composants, mais elle est toujours prête à précipiter facilement.

VIII. *Coloration des noyaux des levures et des bactéries.*

Dans les levures et les bactéries communes, la méthode de Romanowsky montre un ou plusieurs grains, qui ont été également considérés comme des noyaux (Ziemann, Feinberg, Zettnow).

Nous rappellerons que, dans les algues cyanophycées et dans certaines bactéries volumineuses qui s'en rapprochent énormément, M. Bütschli a pu colorer par l'hématoxyline un « corps central » qu'il considère comme correspondant au noyau. Cette manière de voir n'a pas été adoptée universellement, aussi ne saurions-nous insister; d'ailleurs il s'agit de recherches trop spéciales.

TECHNIQUE SPÉCIALE

Nous nous sommes inspirés, pour la première et la seconde partie de la « Technique spéciale », de l'ordre suivi par l'un de nous dans ses « Éléments de microbiologie générale ». Cela nous a paru avantageux, car les chapitres correspondants des deux ouvrages se complèteront ainsi mutuellement. Nous n'avons fait, en conséquence, aux « Éléments de microbiologie générale », que les emprunts strictement nécessaires.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE PRATIQUE DES PRINCIPALES FONCTIONS MICROBIENNES

CHAPITRE I

NUTRITION DES MICROBES

L'étude *pratique* de la nutrition des microbes comprend celle des aliments indispensables à leur vie ; elle comprend aussi l'étude du rôle de l'oxygène et de la température dans le développement de ces organismes, toutes questions traitées à propos de la technique générale. Elle comprend enfin l'étude des fermentations et celle des sécrétions diastasiques et des échanges nutritifs. Nous exposerons successivement les principales *méthodes* usitées dans les recherches qui concernent ces trois derniers points.

I. *Etude des fermentations.*

Les dispositifs auxquels on a recours n'offrent rien de bien spécial. Les appareils employés sont ceux dont on se sert couramment pour les cultures aérobies ou anaérobies. Lorsqu'on désire recueillir les gaz produits, on prend des flacons dont le bouchon porte deux tubes : l'un sert à ensemencer (et à faire

le vide le cas échéant); on le fermera au chalumeau avant la mise en train — l'autre communique avec un tube de dégagement qui se rend dans une cuve à mercure. On peut encore faire usage de ballons dont on scelle le col effilé; on prélève alors les gaz en les extrayant à la pompe à mercure, après avoir brisé l'extrémité de l'effilure dans le tube à vide.

Nous devons maintenant dire un mot des principales fermentations qu'on peut être appelé à étudier.

1° **Fermentation alcoolique.** — On la réalise ordinairement en ensemençant les levûres, hautes ou basses, dans des liquides sucrés, acidifiés ou non. De ces liquides, les principaux sont : l'eau de levûre ou l'eau de touraillons sucrées; le moût de raisin; le moût de bière... ,etc. Selon la levure employée, on s'adressera de préférence à tel ou tel sucre, au glucose, au lévulose, au maltose, au saccharose, et même au lactose. La richesse saccharine, habituellement choisie, est de 10 à 20 pour 100. La température sera de 6° à 8° avec les levûres basses, de 16° à 20° (et davantage) avec les levûres hautes. Nous renvoyons au tome III du traité de microbiologie de M. Duclaux, pour tout ce qui concerne ce vaste sujet, d'une étude par trop spéciale.

2° **Fermentation lactique.** — On peut se procurer du ferment lactique en laissant le lait se cailler à la température ordinaire ou à l'étuve. Ainsi que l'a indiqué M. Pottevin, on peut aussi exposer à l'air du jus d'oignons glucosé à 10 pour 100. Les bactéries lactiques, très nombreuses comme on sait, seront ensuite isolées à l'aide des milieux solides sucrés. Ces bactéries agissent sur beaucoup de saccharides. Si on désire réaliser la fermentation dite classique, on prendra un litre d'eau, 100 grammes de sucre, 10 grammes de vieux fromage et un excès de carbo-

nate de chaux, destiné à saturer (en grande partie) l'acide produit et à reculer ainsi les limites de l'action microbienne. On opérera dans un vase ouvert et on agitera de temps en temps. Après 8 à 10 jours, la fermentation se trouve terminée.

3° **Fermentation butyrique.** — La fermentation butyrique se réalise en ajoutant à deux litres d'eau 100 grammes d'amidon ou de dextrine, 1 gramme



Fig. 114. — Appareil de Pasteur pour la fermentation butyrique.

de sel ammoniac et 50 grammes de carbonate de chaux. On ensemence avec de la terre, du vieux fromage ou de la bouse de vache. Les ferments butyriques, presque tous anaéobies, agissent sur divers sucres, la dextrine, l'amidon et parfois même sur la cellulose.

Nous devons mentionner ici le dispositif qu'imagina Pasteur dans ses mémorables recherches sur les ferments anaérobies, et sur le ferment butyrique en

particulier. On prend un ballon porteur de deux tubulures (fig. 114); l'une se termine par un petit entonnoir cylindrique fermé à l'ouate et muni d'un robinet, l'autre se recourbe et plonge dans une capsule. Le ballon et la capsule sont remplis de solution fermentescible (le ballon complètement, la capsule aux deux tiers); on les chauffe pendant une heure, le robinet de l'entonnoir demeurant ouvert, de manière à bien faire bouillir le liquide, c'est-à-dire à stériliser et à chasser l'air du même coup. On ferme le robinet et on laisse refroidir, puis on ensemence par l'entonnoir sans introduire d'air. L'appareil, représenté sur la figure, permet d'ensemencer directement avec une culture préalable, faite au-dessus du robinet.

4° **Fermentation de l'amidon.** — Un certain nombre de microbes, et surtout de moisissures, saccharifient plus ou moins énergiquement l'amidon. Le meilleur exemple qu'on en puisse citer est celui de l'amylomyces Rouxii (Calmette), couramment employé aujourd'hui dans les distilleries. Dans l'espace de deux ou trois jours, il transforme en sucre le moût de grains liquéfié par 1 à 2 pour 100 de malt. On fait ensuite fermenter alcooliquement le sucre produit, à l'aide de levures pures. Ces opérations, qui portent couramment sur des milliers de litres, se conduisent aussi sûrement que les fermentations de laboratoire. Quand on désire reproduire en petit la saccharification, on prend 15 grammes d'amidon pour 500 centimètres cubes d'eau de levûre; on porte à 100° pendant une demi-heure, puis à 120° pendant le même temps, afin d'obtenir un bon empois (l'amylomyces agit mal sur l'amidon cru); on ensemence ensuite et on met à l'étuve à 38°. L'amylomyces peut, en dernière analyse, transformer en alcool le sucre produit, mais il demeure à cet égard très inférieur aux levûres.

5° **Fermentations diverses des sucres.** — Un bon milieu liquide est le suivant, indiqué par M. Grimbert :

Eau.	1 litre.
Phosphate d'ammoniaque. .	0gr,4
Sulfate de magnésie. . .	0 4
Phosphate de potasse. . .	0 2
Nitrate de potasse. . . .	0 2
Peptone.	2 5
Sucre.	30 à 50 grammes.

Les produits de la fermentation seront dosés par les procédés chimiques habituels. On déterminera la quantité et la nature des alcools par la méthode du compte-gouttes, la quantité et la nature des acides volatils par les distillations fractionnées (Duclaux). L'étude détaillée de ces procédés sortirait du cadre de notre ouvrage.

6° **Fermentation ammoniacale.** — Abandonnée à elle-même, l'urine se trouble bientôt et dégage une odeur ammoniacale. A ce moment, il est très facile d'isoler les bactéries de la fermentation alcaline. Celles-ci sont, comme on sait, très nombreuses, mais l'organisme le plus souvent rencontré est le micrococcus ureæ de Pasteur et van Tieghem. Ensemencé dans des solutions d'urée, il les décompose comme il décompose l'urine elle-même. On fera de préférence les cultures à 33°.

7° **Fermentation acétique.** — Pour obtenir les bactéries acétifiantes, on expose à l'air, en couche mince, un mélange à parties égales de bière, d'eau et de vinaigre. Il ne tarde pas à se former un voile, généralement assez délicat, constitué par le bacterium aceti de Pasteur. Il faut savoir que ce voile peut être remplacé par une membrane épaisse, due au développement du mycoderma vini, sorte de levûre qui brûle l'alcool et l'acide acétique. Le bacterium aceti sera isolé sur une gélatine à l'eau de levure alcoolisée (5-7 pour 100) et acétifiée

(1-2 pour 100). Les colonies pourront ensuite être étudiées par ensemencement dans le vin blanc, étendu de son volume d'eau, puis stérilisé (Wermischeff). On mettra à l'étuve à 22° ou mieux à 33°.

8° **Nitrification.** — Les nitrifiants du sol, c'est-à-dire les ferments nitreux (nitrosomonas et nitrosococcus) et le ferment nitrique (nitrobacter), découverts par M. Winogradsky, constituent un excellent sujet pour l'étude de la nitrification. Nous croyons devoir donner quelques développements à cette intéressante question.

1° *Isolement et culture des ferments nitreux.* — On se servira avec avantage des plaques à la silice. Celles-ci se fabriquent de la façon suivante. On additionne le silicate de potasse du commerce de 3 volumes d'eau. On en verse ensuite 100 centimètres cubes, en agitant, dans 50 centimètres cubes d'acide chlorhydrique étendu. On dialyse pendant 3 jours, le premier jour dans l'eau courante, les deux autres dans l'eau distillée souvent renouvelée. Après 3 jours, le liquide extérieur ne doit plus donner de précipité par le nitrate d'argent. On stérilise alors la silice. On stérilise d'autre part, et séparément, les deux solutions suivantes :

1°	Eau.	50 cent. cubes.
	Sulfate d'ammoniaque. .	0,4 —
	Sulfate de magnésie. .	0,05 —
	Chlorure de calcium. .	traces.
2°	Eau.	50 cent. cubes.
	Phosphate de potasse. .	0,1 —
	Carbonate de magnésie.	0,6 à 0,9.

Après refroidissement, on mélange, et on obtient la solution saline nutritive. Puis on concentre la silice à moitié environ. De temps en temps, on en prélève 3 gouttes, que l'on mêle à une goutte de la solution saline.

Il doit y avoir coagulation au bout de cinq minutes, et, après un quart d'heure, la masse doit conserver l'empreinte du doigt. A ce moment la solution de silice est bonne à employer. On la répartit en boîtes de Petri et, selon la consistance qu'on désire, on ajoute un demi à un volume de solution saline.

On peut ensemencer d'emblée une dilution de terre, mais il est préférable d'opérer sur une première culture impure. Cette première culture sera obtenue en ensemençant la terre dans le milieu suivant :

Eau distillée.	1000 cent. cubes.	
Phosphate de potasse. . .	1	—
Sulfate de magnésie. . . .	0,5	—
Chlorure de calcium.. . .	traces.	
Carbonate de magnésie. . .	0,5 à 1	

On stérilise ; on ensemence ; on ajoute ensuite en plusieurs fois (au fur et à mesure qu'il est consommé par le ferment nitreux) 2 grammes à $2^{gr},50$ de sulfate d'ammoniaque stérilisé ; on veille avec soin à ce qu'il ne soit jamais en excès. La culture est maintenue à 30 degrés. Les ferments nitreux se développent plus ou moins rapidement, sous forme de zooglées, qui adhèrent intimement aux grains de carbonate de magnésie et les dissolvent peu à peu ; elles empruntent à l'acide carbonique de l'air le carbone qui leur est nécessaire. On les prélève et, après dilution, on les ensemence en plaque de silice. Sur ces plaques, les colonies du ferment nitreux se reconnaissent à l'éclaircissement localisé du milieu laiteux, éclaircissement dû à la solubilisation du carbonate de magnésie.

Notons encore qu'on peut isoler les ferments nitreux à l'aide de passages dans le milieu liquide dont nous avons donné la formule. Il faut avoir soin

alors de faire ces passages avant que la période nitreuse ne soit terminée, sans quoi on ensemencerait, en plus de diverses impuretés, le ferment nitrique, dont il serait extrêmement difficile de se débarrasser.

2° *Isolement et culture du ferment nitrique.* — On ensemence la terre dans la solution saline précédente, en remplaçant le sulfate d'ammoniaque par le nitrite de potasse. La proportion de celui-ci doit répondre à 22 milligrammes d'acide nitreux par 50 centimètres cubes de liquide. L'isolement du ferment nitrique se réalise facilement à l'aide de quelques passages. On pourrait aussi recourir aux plaques de silice. Le ferment nitrique forme des flocons minuscules tellement adhérents au vase que le lavage ne les détache pas.

Il nous suffira de rappeler en terminant l'usage du réactif de Nessler pour la recherche de l'ammoniaque, et celui de l'empois d'amidon ioduré pour la recherche des nitrites. Lorsqu'on veut déceler la présence des nitrates, il faut décomposer l'acide nitreux par ébullition avec de l'urée et faire agir la diphénylamine sulfurique (1/500) ou la brucine (2/500). On obtient une coloration bleu foncé dans le premier cas, rouge vif dans le second.

II. *Étude des diastases.*

Les microbes sont d'actifs producteurs de diastases. Celles-ci peuvent demeurer à l'intérieur du corps cellulaire ou diffuser dans le liquide ambiant. D'où deux modes principaux d'obtention des enzymes : l'expression et la macération.

La macération se pratique dans des liquides de nature et de réaction variées (souvent plus de simplicité, dans le liquide de culture lui-même) ; l'expression se réduira ordinairement à un broyage plus ou

moins complet, mais elle nécessite parfois l'emploi de la presse hydraulique.

Les solutions diastasiques une fois obtenues, on peut avoir avantage à concentrer le principe actif en l'entraînant au moyen de divers précipités, mais il faut savoir qu'on n'arrive jamais à obtenir ainsi un produit chimiquement défini et que les tentatives de purification affaiblissent les enzymes d'autant plus qu'elles sont poussées plus loin.

Nous citerons maintenant quelques types de préparation des diastases microbiennes les plus connues.

1° **Présure et caséase.** — La présure coagule le lait, la caséase redissout la caséine. Un certain nombre de bactéries, le tyrothrix tenuis, le b. subtilis, le b. pyocyanique, par exemple, sécrètent les deux diastases. Il suffit, pour s'en convaincre, de filtrer une culture de tyrothrix tenuis (Duclaux), de l'ajouter à du lait et de porter à 35° ; le lait commence par se coaguler, puis le caillot disparaît peu à peu par solubilisation progressive. Si on additionne le lait d'un excès de culture filtrée, il peut y avoir peptonisation très rapide, sans coagulation initiale visible.

2° **Protéases.** — On désigne sous ce nom générique toutes les diastases susceptibles de digérer les matières albuminoïdes. La caséase est donc une protéase. Nous avons vu que beaucoup de microbes liquéfiaient la gélatine et même le sérum coagulé. Le nombre de ceux qui agissent sur la fibrine est fort restreint et ils semblent tous appartenir à la classe des anaérobies (b. putrificus de Bienstock, vibrion septique, b. Chauvæi, etc.). M. Fermi a étudié spécialement les enzymes des bactéries qui liquéfient la gélatine. Il conseille d'additionner d'un antiseptique les cultures sur gélatine et de les ajouter à de la gélatine neuve, en augmentant le plus possible la surface de contact. Lorsqu'on opère au-dessous de 24°,

on voit la gélatine se liquéfier peu à peu ; lorsqu'on opère à 37°, pour activer la digestion, il faut de temps en temps porter le mélange dans l'eau glacée, pour suivre les progrès de la transformation enzymotique. Il importe que la réaction du milieu soit toujours neutre ou légèrement alcaline. M. Malfitano a étudié la protéase sécrétée par l'aspergillus niger. Pour obtenir cette diastase en solution, on prend le mycélium au moment de la sporulation, et on le dessèche rapidement à 35°. On le moud ensuite finement ; on le fait macérer dans l'eau ; on exprime ; on filtre le liquide et on précipite par l'alcool. Si l'opération est fractionnée, les dernières portions du précipité contiendront la substance active dans un état de pureté suffisant. La protéase de Malfitano agit en milieu légèrement acide et offre son activité maxima vers 40°. Elle digère la gélatine, la fibrine, le sérum liquide et la caséine.

3° **Uréase.** — L'uréase est une diastase très fragile, sécrétée par les microbes de la fermentation ammoniacale. Quand on fait agir les cultures filtrées de ces microbes sur une solution d'urée, celle-ci est transformée en carbonate d'AzH^3. L'uréase réclame un milieu alcalin. Son optimum thermique est de 50°.

4° **Amylase, dextrinase, maltase.** — L'amylase transforme l'amidon en dextrine, la dextrinase convertit la dextrine en maltose. La plupart des microbes susceptibles de fournir ces deux enzymes (aspergillus niger, penicillium glaucum, bactéridie charbonneuse, b. subtilis, vibrions divers, etc.) sécrètent aussi de la maltase, qui dédouble chaque molécule de maltose en 2 molécules de glucose. M. Calmette a isolé les 3 diastases de l'amylomyces en opérant comme il suit. Il cultive la moisissure sur moût de bière et, lorsque le développement a pris fin, il remplace le moût par de l'eau stérile. Après un séjour de 60 heures à 38°, les enzymes de l'amylomyces passent dans le liquide

d'extraction, qui se transforme ainsi en une solution active, susceptible de saccharifier énergiquement l'empois d'amidon lorsqu'on opère à 38°.

5° **Sucrase ou invertine.** — C'est la diastase qui dédouble le saccharose en glucose et en lévulose. On peut s'adresser, pour la préparer, soit à l'aspergillus niger, soit aux levûres.

a) L'aspergillus est ensemencé dans le liquide Raulin, en grande surface. On soutire le liquide après 4 jours et on lave le mycélium en le faisant flotter deux ou trois fois sur de l'eau distillée. On le laisse ensuite reposer pendant 24 ou 48 heures sur une nouvelle quantité d'eau qui, grâce à une véritable macération de la moisissure, se charge peu à peu des diverses diastases sécrétées par l'aspergillus. Cette solution est donc impure, mais elle possède une grande activité.

b) Les levûres, macérées dans l'eau chloroformée, fournissent des solutions encore moins pures.

On a conseillé de « purifier » l'invertine en précipitant les liquides de macération par l'alcool, redissolvant et recommençant l'opération à plusieurs reprises. On n'obtient ainsi que des produits peu actifs.

L'invertine offre son maximum d'énergie entre 50° et 56°. Les acides exercent une action favorable, à des doses qui varient selon la sucrase et l'acide employés. Pour doser la sucrase, on prend comme unité la quantité d'enzyme susceptible d'intervertir 20 centigrammes de saccharose en une heure, à 56°, en présence d'un pour 100 d'acide acétique. On se sert d'une solution de saccharose à 50 pour 100. Après une heure, on refroidit rapidement, on neutralise à la soude (pour arrêter la transformation) et on dose la quantité de sucre interverti, en se rappelant que 0.4941 de sucre interverti réduit 100 centimètres cubes de liqueur de Fehling (Fernbach).

6° **Zymase.** — Nous indiquerons sommairement sa préparation, qui ne saurait être réalisée dans des laboratoires ordinaires.

On prend un kilogramme de levûre, que l'on broie mécaniquement pendant 2 heures avec un kilogramme de sable quartzeux et 250 grammes de terre d'infusoires. On soumet la masse lentement et graduellement (à l'aide d'une presse hydraulique) à une pression de 500 atmosphères. On recueille ainsi 320 centimètres cubes de liquide. La masse originelle, triturée avec 140 centimètres cubes d'eau, est pressée à nouveau pendant 2 heures. On récolte alors 180 centimètres cubes de liquide, qu'on ajoute au premier. Le mélange est agité avec 4 grammes de terre d'infusoires, filtré sur papier et versé dans un récipient refroidi. Le suc de levûre, ainsi obtenu, se montre très fragile. Il fait fermenter tous les sucres que font fermenter les levûres et d'autres sucres encore, le glycogène notamment. Il agit en milieu neutre, ou légèrement alcalin. L'optimum thermique se trouve dans le voisinage de 21° (Buchner).

III. *Étude des échanges nutritifs.*

Elle comprend celle de l'assimilation et de la désassimilation, ainsi que l'étude des modifications des milieux sous l'influence du développement microbien.

1° **Assimilation.** — L'assimilation constitue un acte des plus complexes ; aussi est-elle fort mal connue. Le seul document intéressant que nous ayons à mentionner a trait à la fixation de l'azote atmosphérique par les microbes des nodosités des légumineuses. Ainsi que l'a démontré M. Mazé, ces organismes sont abondamment répandus dans le sol. Ils se trouvent attirés par les hydrates de carbone que laissent diffuser les poils radiculaires, pénètrent dans la racine et

là s'entourent d'une gaine muqueuse que la sève résorbe au fur et à mesure de sa production. Ce mucus représente l'aliment azoté élaboré par le microbe au profit de la papillonacée. A l'élaboration prennent part deux facteurs principaux : l'azote fourni par l'air extérieur et les hydrates de carbone fournis par la plante. Les microbes radicoles transforment ces derniers, grâce à la fixation d'azote, en une substance quaternaire spéciale, gélatiniforme et hautement nutritive. Pareille chose se voit dans les cultures artificielles, à la condition que l'on procure aux bactéries une certaine quantité d'azote combiné, dont elles ont besoin pour leur propre développement, et de l'oxygène en abondance. Si donc, comme l'a indiqué M. Mazé, on ensemence les microbes en couche mince (matras coniques) sur de la gélose au bouillon de haricots sucré (dont nous avons donné la formule dans la technique générale) et si, maintenant la température à 20°-25°, on fait passer régulièrement un courant d'air, on observera à la fois la disparition d'une certaine quantité d'azote gazeux et la formation d'un dépôt muqueux exubérant qui recèle cet azote, désormais combiné avec les produits de transformation du sucre de canne. Dans les meilleures expériences, les bactéries ne fixent qu'un gramme d'azote libre pour 100 grammes de saccharose consommé.

2° **Désassimilation.** — On trouve dans les milieux de culture 3 ordres de substances : les secreta, les résidus des actes zymotiques et les excreta. Ces derniers constituent les produits de désassimilation proprement dits. Il sont excessivement variés et souvent difficiles à distinguer des reliquats de fermentation, et même de certaines sécrétions. Le produit d'excrétion le plus intéressant est l'*indol*. Ce composé aromatique est assez répandu et sa recherche peut avoir quelque valeur diagnostique. Il se reconnaît à la

coloration rouge qu'il donne par l'acide sulfurique en présence des nitrites.

Lorsqu'un microbe produit à la fois de l'indol et des nitrites, il suffit d'ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique (exempt de nitrites) à une culture liquide pour voir apparaître la teinte caractéristique ; c'est le cas de nombreux vibrions, cholériques ou non, qui donnent, comme on dit, la « réaction indol-nitreuse ». Lorsque le microbe fournit de l'indol, mais n'engendre pas de nitrites, il faut additionner préalablement la culture d'une trace de nitrite de potasse (1 centimètre cube de solution à 2 pour 10 000, pour 5 à 6 centimètres cubes de culture) ; c'est le cas du coli-bacille type et du proteus vulgaris. Pour mieux mettre en évidence la production du pigment rouge, il est indiqué d'agiter le liquide avec un peu d'alcool amylique, dans lequel celui-ci se dissout (Grimbert).

La présence de sucres fermentescibles diminue, ou même empêche, la formation du composé aromatique. On se servira donc exclusivement de cultures en bouillon exempt de sucre, ou, plus simplement, en eau peptonisée. Nous faisons toujours, pour notre part, usage d'eau peptonisée à 2 pour 100. M. Morris recommande la proportion de 6 pour 100 ; ils insiste également sur ce fait, déjà connu, qu'il faut parfois laisser vieillir un peu les cultures pour observer la réaction caractéristique. Dans les cas douteux on fera donc bien d'attendre jusqu'à 8 et 10 jours.

3° **Modifications des milieux.** — a) *Changements de réaction.* — Rappelons tout d'abord les deux exemples classiques ; le bacille lactique acidifie le lait (alcalin) et le micrococcus uræ alcalinise l'urine (acide). Tous les microbes susceptibles de déterminer les fermentations lactique, butyrique..., etc., acidifient le milieu lorsque celui-ci contient des corps sensibles à leur action (sucres, alcools polyatomiques). Parmi

les saccharides, nul n'est attaqué par un plus grand nombre d'organismes que le glucose. Aussi les bouillons glucosés s'acidifieront-ils sous l'influence de beaucoup de bactéries : coli-bacilles, vibrions, b. typhique, pneumocoque, streptocoque, etc. Dans du bouillon (non peptonisé et sans sel) additionné de glucose, le maximum d'acidité est atteint en 24 heures pour le b. typhique et le vibrion cholérique — en 24 à 36 heures pour le streptocoque — en 2 jours 1/2 pour le staphylocoque — en 3 ou 4 jours pour le proteus (Hellström).

La production d'alcali tient en général à l'oxydation des matières azotées. Elle atteint son maximum chez les aérobies, surtout chez ceux qui se développent en voile à la surface des liquides (b. subtilis, tyrothrix tenuis, b. pyocyanique) ; mais nombre de ces microbes jouissent également de la propriété de fermenter les saccharides. Il en résulte que, suivant l'organisme en jeu, la composition du milieu et les conditions de culture, la réaction résultante pourra aller de l'acidité marquée à une forte alcalinité. Ensemencé en bouillon ordinaire (c'est-à-dire sucré) le bacille diphtérique produit d'abord de l'acide, puis de l'alcali. La réaction alcaline apparaît d'autant plus vite que le développement se fait en couche plus mince et plus aérée. Dans le vide, l'acidité persiste. Si on cultive le vibrion cholérique sous une certaine épaisseur dans le petit lait additionné de tournesol bleu, on constate la présence de 3 couches différentes. A la partie supérieure, coloration bleu foncé (oxydation intense des matières azotées); au-dessous, teinte rouge vif (fermentation du lactose ; acidité non neutralisée); profondément, décoloration (réduction liée à la vie anaérobie) [Dionys Hellin].

b) *Phénomènes d'oxydation et de réduction.* — Les microbes aérobies sont susceptibles d'oxyder non seu-

lement les substances organiques azotées et ternaires, mais encore les composés minéraux eux-mêmes. L'exemple des microbes nitrifiants est bien connu. M. Winogradsky a montré, d'autre part, que c'est par un phénomène d'oxydation que les sulfo-bactéries décomposent H^2S pour fixer le soufre et qu'elles transforment ce soufre en sulfate, quand H^2S fait défaut.

Les phénomènes de réduction sont plus intéressants et ils nous retiendront plus longtemps. Les anaérobies constituent, nous le savons déjà, de puissants réducteurs, susceptibles de s'attaquer facilement aux matières colorantes. D'après M. Müller, certains microbes (anaérobies stricts ou facultatifs) réduisent mieux le bleu de méthylène (c'est le cas le plus général), d'autres le tournesol; on aura donc cette distinction présente à l'esprit, quand il s'agira d'utiliser les indicateurs colorés.

Comme application du pouvoir réducteur des microbes, on ne saurait mieux faire que de citer l'emploi du *penicillium brevicaule* (Gosio) dans la recherche de l'arsenic. On connaît la fréquence des empoisonnements chez les gens qui habitent des chambres contenant des papiers, des étoffes, des tapis, etc..., teints à l'aide de composés arsenicaux. Ces empoisonnements sont dus à des émanations gazeuses provenant d'altérations microbiennes. Ce fait a servi de point de départ aux recherches de MM. Gosio, Bujwid, Abba, Abel et Buttenberg. Après avoir constaté que les bactéries, les levûres et les streptothricées n'attaquent pas les combinaisons arsenicales, ces derniers auteurs se sont adressés aux moisissures; l'expérience a montré que, sur 40 espèces examinées, 10 possédaient la propriété de réduire l'acide arsenieux.

Pour pouvoir être utilisée dans la recherche de l'arsenic, une moisissure doit présenter les caractères suivants : elle se développera rapidement, ne dégagera pas

d'autre odeur que celle de l'ail, pourra se contenter d'aliments médiocres, sera capable à la fois de supporter beaucoup d'arsenic et d'en déceler des traces, et manifestera son action sur l'arsenic lui-même et tous les sels de ce métalloïde. Le penicilium brevicaule, reconnaissable à ses spores gris brun, répond à toutes ces exigences.

La technique recommandée par MM. Abel et Buttenberg est la suivante. On divise le corps à examiner; on le mêle intimement à de la mie de pain; on ajoute un peu d'eau et on stérilise. On ensemence avec le penicillium et on place le flacon, capuchonné avec soin, dans l'étuve à 37°. Le penicillium se développe au bout de 24 à 72 heures; dès que la croissance s'est produite, on recherche si la culture dégage l'odeur alliacée caractéristique. Lorsqu'aucune odeur ne se fait sentir, on attend jusqu'au troisième ou au quatrième jour. Il est bon de faire avec le même pain et la même eau deux cultures témoins, l'une sans acide arsénieux et l'autre avec cet acide.

Selon l'odorat de l'opérateur, la méthode est susceptible de déceler de $0^{gr}.00001$ à $0^{gr},000001$ d'acide arsénieux. Elle dénote tous les composés arsenicaux à la dose de $0^{gr},00001$ et l'arsenic métallique à la dose de $0^{gr},0001$. Elle a permis de déceler la présence de l'arsenic dans un grand nombre de composés chimiques (acides minéraux, soufre, sous-nitrate de bismuth, sulfate de magnésie); dans des objets très divers, tels que peaux, papiers, étoffes, tapis, pastels, anciennes couleurs d'aniline; dans certaines eaux minérales (Levico et Roncegno); dans les organes d'animaux empoisonnés par l'arsenic; dans les urines ou les cheveux de personnes travaillant l'arsenic, intoxiquées par lui ou simplement traitées par les préparations arsenicales. Cette méthode présente sur les procédés chimiques un certain nombre d'avantages. Elle est plus sensible

plus pratique, plus rapide; elle permet de faire en quelques jours un nombre très grand d'analyses, mais elle exige une certaine éducation du sens de l'odorat.

Tout récemment, M. Gosio a fait connaître une simplification du procédé Abel et Buttenberg. Il conseille de déposer la substance à examiner sur le mycelium jeune, en multipliant les contacts le plus possible. Avec une culture fraîche, on pourrait obtenir l'odeur caractéristique en 10 minutes. Pour M. Gosio, cette odeur est due à la diéthylarsine; le penicillium brevicaule représenterait donc un ferment alcoolique.

c) *Dégagement d'hydrogène sulfuré.* — Nombre de micro-organismes émettent, bien qu'en quantité très variable, de l'H^2S. La source de celui-ci doit être recherchée dans les albuminoïdes, les sulfates et le soufre lui-même. Il est en effet des organismes qui dégagent H^2S lorsqu'on ajoute du soufre à leur milieu de culture. La production d'acide sulfhydrique reconnaît pour cause tantôt un acte zymotique véritable (Rubner) tantôt un phénomène de réduction, lié à la présence de l'H. naissant (Petri et Maassen). L'odorat ne suffit pas toujours pour constater la production gazeuse. Le papier plombique est plus recommandable mais, d'après M. Morris, le meilleur moyen consiste encore à faire de la gélose droite (couche haute), additionnée de 10 pour 100 de sucre de plomb. On ensemence par piqûre et on observe, dans les cas positifs, un noircissement tout le long de la piqûre; à la surface, le noircissement est à peine marqué ou fait défaut, grâce à l'oxydation d'H^2S. A 37°, le b. typhique, le vibrion cholérique, le staphylocoque et le proteus vulgaris donnent la réaction au bout de 24 heures; le bacille de la morve, le b. coli et le v. Metchnikovii la fournissent au bout de 48 heures; le pyocyanique en

3 jours. La bactéridie charbonneuse et le b. de Löffler ne réduisent pas le sucre de plomb. La gélose doit être préférée à la gélatine, dans laquelle la réaction est moins nette et surtout au bouillon, où elle est rendue quasi-impossible par les précipités que provoque le sel plombique.

CHAPITRE II

PRODUCTION DE MATIÈRES COLORANTES ET DE LUMIÈRE

I. *Microbes chromogènes.*

Lorsqu'on désire étudier la formation des matières colorantes, on s'adresse généralement au *bacillus prodigiosus,* qui fournit un pigment insoluble, ou au *bacille pyocyanique,* qui sécrète des pigments diffusibles. Nous indiquerons les principales expériences concernant ces deux organismes. Elles suffiront largement pour ceux de nos lecteurs qui ne veulent pas se livrer à l'étude spéciale des bactéries chromogènes.

A) Bacillus prodigiosus. — Le b. prodigiosus est un saprophyte, qui se cultive dans tous les milieux usuels et donne, sur les solides ou à la surface des liquides, une belle matière colorante rouge. Il est décoloré par le Gram et liquéfie la gélatine et le sérum coagulé.

Caractères du pigment. — Il est soluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, insoluble dans l'eau. Pour l'extraire, on dessèche la couche développée sur un milieu solide ; on la traite par l'alcool aiguisé d'acide chlorhydrique ; on précipite par l'eau ; on filtre ; on lave à l'eau et on sèche sur porcelaine ; on obtient ainsi un produit impur, se présentant sous la forme d'une masse molle comme de la cire (Scheurlen). Les solutions alcooliques, rouges quand la réaction est neutre, jaunissent par les alcalis et deviennent

violettes par les acides. Les réducteurs les décolorent.

Production d'une race incolore. — La race incolore est fort peu stable. Pour l'obtenir, on peut faire des cultures à 37°, température à laquelle le microbe pousse sans donner de pigment (Schottelius). On peut encore pratiquer des passages dans des milieux très alcalins, également défavorables à la sécrétion de la couleur (Wasserzug). On combinera avantageusement les deux moyens. On peut enfin chauffer plusieurs fois les cultures à 50° pendant 5 minutes (Wasserzug) ou sélectionner les colonies achromiques formées naturellement (Schottelius). Quand on pratique des séparations sur gélatine avec une culture pure de b. prodigiosus, on trouve toujours en effet quelques colonies incolores; si on fait des plaques avec celles-ci, le nombre des colonies achromiques augmente de plus en plus; cependant, quel que soit le nombre des passages, quand on réensemence en large surface ces colonies incolores, elles donnent toujours çà et là des amas pigmentés.

Influence du sulfate de magnésie sur la secrétion du pigment. — M. Kuntze a montré que le sulfate de magnésie était indispensable au b. prodigiosus pour que celui-ci pût sécréter son pigment. Lorsqu'on veut s'en assurer, il faut s'adresser à des milieux artificiels préparés avec des corps chimiquement purs. Faute de cette précaution, on peut croire à l'absence du sulfate de magnésie, alors que celui-ci existe en proportion strictement suffisante comme, par exemple, dans le glucose du commerce.

Le prodigiosus pousse sans former de couleur dans le liquide suivant :

Asparagine ou lactate d'ammoniaque. .	1 — 2	pour 100.
Glucose.	2 — 4	—
(ou glycérine.	4 — 5	—
Phosphate dipotassique.	0,1—0,2	—

Si on ajoute 0,2 pour 100 de sulfate de magnésie, le pigment apparaît. Prenons encore du liquide Uschinsky sans sulfate de magnésie et ensemençons le b. prodigiosus. Il se développera incolore. Ajoutons 0,001 pour 100 de sulfate de magnésie, la couleur apparaîtra déjà avec cette faible dose.

B) Bacille pyocyanique. — Le bacille pyocyanique (dont les caractères seront exposés ultérieurement) est susceptible de fournir 3 pigments différents, bien étudiés par M. Gessard :

1) Le pigment vert fluorescent.
2) La pyocyanine.
3) Le pigment verdâtre non fluorescent.

Caractères des pigments. — Le pigment vert fluorescent représente une substance jaune, insoluble dans l'alcool, l'éther, le sulfure de carbone, la benzine. Il offre un ton jaune orange en solution aqueuse concentrée. Il est caractérisé par sa fluorescence verte, qu'avivent les alcalis et que détruisent les acides. Il résiste assez fortement aux réducteurs et se transforme à la longue, par oxydation, en pigment feuille-morte (Gessard). Le pigment vert fluorescent est fourni non seulement par le b. pyocyanique, mais encore par un grand nombre de saprophytes. Il paraît toujours le même, quelque soit le micro-organisme en cause.

La pyocyanine, isolée par Fordos en 1860, se dissout non seulement dans l'eau, mais encore dans le chloroforme. Les acides la transforment en un composé rose, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme. On utilise ces propriétés quand on veut extraire le pigment des cultures en bouillon, qui contiennent en outre du pigment vert fluorescent. Celles-ci sont traitées par le chloroforme, qui dissout le colorant bleu ; l'autre demeure en solution. On décante le

bouillon, puis, comme le chloroforme a pu dissoudre des matières grasses du milieu, on verse au-dessus de lui un peu d'eau acidulée et on agite. La pyocyanine, transformée en pigment rose, passe dans l'eau. On décante cette eau, on alcalinise et on dissout la couleur bleue, régénérée, à l'aide de $CHCl^3$. En recommençant l'opération plusieurs fois, on obtient finalement une solution chloroformique de pyocyanine pure, qu'on laisse cristalliser par évaporation. Le pigment se conserve bien en solution acide; en solution alcaline ou en cristaux, il s'oxyde à l'air et jaunit (transformation en pyoxanthose — Fordos). Les réducteurs le décolorent aisément. C'est ce qui arrive constamment pour les cultures en bouillon. Celles-ci offrent, en effet, une teinte jaunâtre, qui redevient bleu vert par simple agitation.

Le pigment vert non fluorescent est peu intéressant. Dans les vieilles cultures, il se convertit, par oxydation, en une substance d'un rouge brun (Gessard).

Production de races variées. — Le bacille du pus bleu normal (race A de M. Gessard) fournit dans le bouillon la pyocyanine et le pigment vert fluorescent; dans l'albumine la couleur verte fluorescente seule; sur la gélose glycérinée la pyocyanine et le pigment verdâtre, non fluorescent; dans l'eau peptonisée glucosée ce dernier seul. On produit la race P (exclusivement pyocyanogène) lorsqu'on reporte en bouillon le microbe cultivé pendant un an dans l'albumine (où pourtant il ne donne que du vert fluorescent). On crée la race F (exclusivement fluorescigène vis-à-vis du bouillon) en chauffant 5 minutes à 57° une culture de la race A; ou bien en faisant passer cette race A par l'organisme du lapin. Enfin on obtient la race S (incolore en bouillon) quand on chauffe la race F ou qu'on l'inocule au lapin. Il est à noter que les types F et S transportés sur la gélose

glycérinée (milieu d'épreuve) reprennent les caractères du bacille normal. Ils n'étaient donc modifiés que par rapport au bouillon.

II. *Microbes lumineux.*

Les microbes lumineux s'isolent d'ordinaire des eaux marines. Ce sont eux qui occasionnent la phosphorescence de la mer. Ils se cultivent facilement sur la gélatine ou la gélose au bouillon de poisson, additionnées de 10 pour 100 de sel marin. M. Beyerinck conseille la formule suivante :

Bouillon de poisson à l'eau de mer.. .	100 grammes.
Gélatine.	8 —
Asparagine.	0,50
Glycérine.	1 gramme.
Peptone.	0,50

On pourrait évidemment remplacer la gélatine par la gélose. On se rappellera que la phosphorescence n'apparaît qu'à la surface des colonies. L'oxygène se montre en effet indispensable et il n'y a pas de lueurs dans le vide. L'optimum thermique de luminescence varie selon le microbe en jeu ; il est ordinairement inférieur à l'optimum de développement. Par cultures successives à haute température, on fait diminuer, puis disparaître, le pouvoir photogène. Par sélection, on peut obtenir, inversement, des races très lumineuses. On fera des séries successives de séparations sur gélatine, en choisissant toujours les colonies les plus brillantes. La phosphorescence peut être suffisante pour permettre de lire l'heure à une montre. Dans ce dernier cas (mais toutefois avec un long temps de pose) il sera possible de photographier les colonies à leur propre lumière.

CHAPITRE III

ACTION DE DIVERSES CAUSES NUISIBLES SUR LES MICROBES. PRODUCTION EXPÉRIMENTALE DES FORMES INVOLUTIVES, DE L'ASPOROGÉNIE ET DE LA PERTE DES CILS.

I. *Action des causes nuisibles.*

Les principaux facteurs, susceptibles d'exercer une influence nocive sur les microbes, sont la dessiccation, la chaleur, la lumière et les antiseptiques. Nous les étudierons successivement, mais nous devons faire remarquer auparavant que, quel que soit celui de ces facteurs qu'on envisage, son action sera d'autant plus marquée que le microbe choisi est moins virulent, le nombre des germes plus faible, la durée de l'expérience plus prolongée. Il faut aussi tenir grand compte de l'âge des microbes, de la réaction et de la nature du milieu qui les contient. On peut dire qu'en thèse générale le bouillon « protège » mieux que l'eau physiologique, les sérosités mieux que le bouillon. Si le microbe s'est développé dans les sérosités, il est plus difficile à détruire que si on l'y a émulsionné après son développement. Rappelons enfin que les endospores des bactéries résistent infiniment mieux que les formes mycéliennes, tandis que les conidies des moisissures et les ascospores des levûres l'emportent bien peu sur les formes végétatives correspondantes.

A. Dessiccation

On dessèche ordinairement les microbes sur des lamelles stériles. On s'adressera, selon les cas, aux produits pathologiques ou aux cultures. Les émulsions de cultures jeunes, développées sur milieux solides, sont les plus employées dans le second cas. On étale le produit ou l'émulsion en couche plus ou moins mince, et on abandonne à la dessiccation dans un flacon bien fermé ou, si on veut que l'action soit plus rapide, dans un exsiccateur garni de $CaCl^2$. Parfois même, on dessèche dans le vide, sur l'acide sulfurique, pour avoir un effet brutal. Lorsqu'il s'agit d'étudier la résistance des microbes dans la terre, le sable, etc..., ou sur des étoffes, du bois, etc..., on les incorpore à ces substances ou on les répartit à leur surface. Quoi qu'il en soit, il faut avoir soin de procéder d'une façon rigoureusement aseptique et de maintenir pendant toute la durée de l'opération une température bien constante. Il va de soi que, si on se propose de comparer la résistance de divers microbes, il est indispensable de se placer dans les conditions expérimentales les plus voisines possibles.

L'opération terminée, on ensemence les lamelles (prises comme type) dans le milieu liquide le plus favorable au développement du microbe envisagé (bouillon peptonisé, dans la majorité des cas), ou bien on délaie la couche adhérente pour l'inoculer à l'animal le plus sensible. Dans certains cas (tuberculose par exemple) l'inoculation est seule de mise. Elle est parfois préférable à la culture. Il y a donc avantage à employer les deux moyens de contrôle chaque fois qu'on le peut.

Si on ne désire pas pousser la dessiccation jusqu'à la mort de tous les germes en expérience, il faut,

pour compter ceux qui sont restés vivants, faire un certain nombre de lamelles et les ensemencer à des intervalles variés. On délaie la couche microbienne dans un peu d'eau stérilisée et on coule en plaques de gélatine ou de gélose. On pourrait aussi recourir à l'emploi des lamelles de gélatine, conseillées par M. Walliczek, ou bien encore dessécher les germes après les avoir incorporés à une poudre, soluble ou non (voir plus loin les expériences de M. Miquel).

On se rappellera que la vitalité se conserve d'autant plus longtemps que la couche étalée est plus épaisse, que la dessiccation a été moins rapide et que la température est demeurée plus basse. Enfin, en matière de germes non sporulés, on tiendra grand compte de l'âge des cultures employées, la résistance augmentant pendant les premiers temps du développement pour diminuer ensuite.

Le substratum a, lui aussi, une grande influence. C'est ainsi que le bacille typhique résiste à la dessiccation, 21 jours dans la terre de jardin, plus de 30 jours dans les balayures, 32 jours sur des morceaux de bois et jusqu'à 72 jours sur des tissus de laine ou de coton (Uffelmann).

La différence de résistance des micro-organismes, suivant qu'ils sont empruntés à des cultures ou à des produits pathologiques, est démontrée par les chiffres suivants, que nous empruntons à MM. Roux et Batzaroff. Le bacille de la peste survit 19 jours à la dessiccation quand on opère sur les cultures; il survit au moins 38 jours s'il s'agit de pulpes d'organes.

B. Chaleur

Il faut envisager séparément l'action de la chaleur sèche et celle de la chaleur humide.

Chaleur sèche. — Lorsqu'on désire étudier son

influence, on dessèche les micro-organismes sur lamelle ; mais avec précaution, car il importe d'atténuer ici, le plus possible, les inconvénients de la dessiccation. On les place ensuite dans une étuve sèche parfaitement réglée où on les laisse plus ou moins longtemps. On procède enfin aux ensemencements ou aux inoculations comme dans le cas précédent.

Chaleur humide. — On emploiera, encore ici, soit les cultures liquides, soit les émulsions de cultures solides, soit les humeurs ou émulsions d'organes. Il faut que les germes soient répartis très également dans le liquide ; aussi se trouvera-t-on bien de filtrer sur de la ouate hydrophile les cultures ou émulsions préalablement agitées ; on évitera ainsi les amas microbiens. Le véhicule ordinairement employé pour les émulsions est une solution de NaCl à 7,5 pour 1000 (eau physiologique) ; on n'oubliera pas qu'elle protège moins que le bouillon. Le chauffage se fera au bain-marie en ampoules complètement pleines et scellées, afin d'éliminer l'action de l'air. On n'introduira les ampoules qu'une fois le bain réglé à la température voulue ; et, l'opération terminée, on les refroidira rapidement avant de faire les cultures ou les inoculations. Le chauffage est d'autant plus exact que l'ampoule offre de plus petites dimensions ; l'idéal est réalisé par une simple effilure. MM. Wladimiroff et Kressling ont chauffé parallèlement des émulsions du bacille de la peste en tubes capillaires et en tubes à essai. Les germes renfermés dans les tubes capillaires ont été détruits à 58° au bout de 4 minutes ; à 54° au bout de 15 minutes ; à 50° au bout de 2 heures. Ceux qui étaient contenus dans les tubes à essai ont été tués après 8 minutes à 58° ; 30 minutes à 54° ; 4 heures à 50°. Cet exemple montre bien quelle est l'influence de la masse. On connaît aussi, depuis les recherches de Pasteur,

l'influence de la réaction du liquide ; nous ne reviendrons pas sur celle de sa nature.

C. Lumière

On peut exposer à l'insolation des produits desséchés ou des liquides contenus dans des ampoules pleines et scellées. On combine parfois aussi volontairement l'action de l'air et celle de la lumière. Dans le cas d'une culture liquide, il ne faut pas oublier que la lumière agit non seulement sur les microbes, mais encore sur le milieu lui-même. M. Duclaux a montré en effet que le bouillon, insolé pendant 3-4 heures, devenait impropre à la germination des spores charbonneuses, l'action de l'air ayant fait naître, par oxydation, aux dépens des matériaux du milieu nutritif, de véritables antiseptiques. Les ampoules soumises à l'insolation pendant les grandes chaleurs seront suspendues à l'aide d'une ficelle, pour éviter tout contact avec les corps voisins fortement échauffés. En prenant cette précaution, M. Roux n'a jamais vu le soleil déterminer, dans les liquides en expérience, une élévation thermique supérieure à 39°. Il va sans dire que cette constatation n'est valable que pour les climats tempérés et que, dans les pays chauds, on devra choisir un moment propice ou éliminer l'action des rayons calorifiques. On tiendra toujours grand compte de l'intensité de la lumière. Enfin, dans certains cas, on pourra faire agir isolément telle ou telle radiation colorée.

On doit à M. Buchner une méthode élégante qui permet de démontrer l'influence de la lumière sur les microbes. De la gélose liquéfiée, puis richement ensemencée, est coulée dans une boîte de Petri. Sur le fond de la boîte, on colle un disque de papier noir portant des lettres découpées à jour. On insole la

boîte, le fond dirigé vers le haut. Puis on met à l'étuve ; une fois le développement accompli, on s'aperçoit que la couche bactérienne offre des solutions de continuité correspondant aux découpures du papier et présentant la configuration des lettres choisies. Il est aisé de faire l'expérience inverse, en collant, sur le fond de la boîte, des lettres pleines en papier noir.

D. Antiseptiques

On peut se proposer deux problèmes différents : étudier la valeur comparée de divers antiseptiques vis-à-vis d'un organisme choisi comme test-objet ; ou, inversement, la valeur d'un antiseptique donné vis-à-vis de différents microbes. Nous nous bornerons à signaler le cas où l'on cherche à déterminer la dose minima de désinfectant susceptible d'empêcher le développement d'un organisme. Il suffit de faire, avec ce désinfectant, une série de dilutions dans des milieux de culture appropriés et de les ensemencer,

Nous étudierons successivement la désinfection par les antiseptiques à l'état de solution et la désinfection par les substances gazeuses ou volatiles.

1° Antiseptiques en solution.

On peut soumettre à leur action des produits liquides ou desséchés. De toute façon, l'opération comprend 3 temps : la préparation des produits, la désinfection et le contrôle, par la culture ou l'inoculation.

A. *Préparation des produits.*

1° Produits desséchés. — Lorsqu'on voudra étudier l'action de divers antiseptiques sur les microbes sporulés, on choisira de préférence comme test-objet les spores charbonneuses. Elles conservent

indéfiniment la même résistance, si on les maintient à 7° après dessiccation. On sait qu'elles ont été préconisées pour la première fois par M. Koch. Les staphylocoques conviennent particulièrement, pour l'étude des antiseptiques vis-à-vis des microbes non sporulés. Ils supportent assez bien la dessiccation, à condition que celle-ci ne se prolonge pas au delà d'un ou deux jours (Krönig et Paul). D'ailleurs, dans les expériences qui nous occupent, il s'agit d'obtenir des résultats comparables entre eux et non des chiffres absolus. Lorsqu'on étudie, au contraire, l'action d'un même antiseptique vis-à-vis de divers microbes, il faut tenir grand compte de l'influence qu'exerce sur chacun de ceux-ci le desséchement préalable, et c'est là un problème fort délicat. Pour apprécier cette influence, on se trouvera donc bien de faire chaque fois des témoins.

On desséche d'habitude les microbes sur des fils de soie, des lamelles ou des perles de verre. Les fils de soie présentent l'inconvénient de ne pas se charger d'un nombre égal de germes, lorsqu'on les immerge dans une émulsion bactérienne. Ils favorisent par leur structure l'inégale répartition des micro-organismes et retiennent toujours une forte proportion d'antiseptique, impossible à enlever complètement. Les lamelles et les perles de verre ne sont jamais parfaitement mouillées par les solutions antiseptiques. Pour ces motifs, MM. Krönig et Paul préfèrent employer des grenats. Lamelles, perles de verre ou grenats doivent être d'abord lavés aux acides, puis successivement à l'eau, à l'alcool et à l'éther ; on les stérilise ensuite par la chaleur sèche. Les fils de soie sont stérilisés par la chaleur humide. On prépare, d'autre part, une émulsion homogène de spores charbonneuses ou de staphylocoques et on la passe sur de l'ouate hydrophile. On plonge dans l'émulsion des fils de soie

d'égale longueur, des perles de verre ou des grenats d'égal volume ; ou bien on étale les germes le plus également possible sur des lamelles semblables. A moins de contre-indication spéciale, tous ces objets sont ensuite desséchés à 7° sur le chlorure de calcium.

2° Produits liquides. — Ils ne nécessitent aucune préparation. On évite donc ainsi l'influence de la dessiccation, ce qui est précieux pour les organismes non sporulés. Cet avantage se trouve malheureusement contre balancé, comme nous le verrons, par bien des inconvénients, lors des opérations ultérieures.

B. *Désinfection.*

Elle comprend elle-même deux temps : le séjour dans le désinfectant et la neutralisation de celui-ci.

1° Produits desséchés. — On plonge les fils de soie, lamelles, etc., dans la solution désinfectante. Dans les expériences qui ont pour but de comparer divers antiseptiques, il faut que non seulement le nombre des germes soit à peu près égal, mais encore que l'on fasse agir les antiseptiques à la même température et pendant le même temps. Il faut aussi que ces désinfectants soient employés en solution équimoléculaire, c'est-à-dire contenant par litre le même nombre de grammes-molécules (Krönig et Paul). Une fois sortis de la solution désinfectante, les fils de soie, lamelles, etc., sont lavés à l'eau stérilisée pour les débarrasser de l'antiseptique simplement adhérent. Pour les priver de l'antiseptique intimement fixé qui les « teint » véritablement, il faut avoir recours à un neutralisant approprié. On neutralisera les acides par l'ammoniaque à 1-7 pour 100 ; les bases par l'acide acétique étendu ; le chlore et le brome par l'ammoniaque à 1-7 pour 100 ; l'iode par le thiosulfate de soude à 5 pour 100 ; le permanganate de potasse par le sulfite de soude ; l'eau oxygénée par le permanganate ; les sels

métalliques par le sulfhydrate d'ammoniaque à 3 pour 100, etc... La neutralisation n'est pas toujours facile; l'ammoniaque ou le bisulfite de soude, indiqués dans le cas du formol, ne sont pas absolument satisfaisants. L'ammoniaque étendue ou l'alcool absolu (agissant simplement comme dissolvants) donnent des résultats encore moins bons avec le phénol et ses homologues. Après neutralisation, on lavera à l'eau stérile. Il va de soi que toutes les opérations doivent être conduites aseptiquement.

2° Produits liquides. — On transporte des volumes égaux de cultures liquides, ou d'émulsions de cultures solides (bien agitées), dans les solutions antiseptiques choisies; on laisse agir un certain temps; puis, après avoir bien agité, on prélève des volumes donnés et on les ensemence dans de grandes quantités de milieux de culture. On élimine ainsi, par dilution, l'action de l'antiseptique simplement adhérent, mais non celle de l'antiseptique intimement fixé. On pourrait obtenir des résultats meilleurs en recourant au centrifugage. Le centrifugage permet en effet de laver les dépôts, de les neutraliser et de les laver encore avant l'ensemencement, mais il expose à perdre un certain nombre de germes.

C. *Contrôle.*

1° Produits desséchés. — Les fils de soie, les lamelles ou les perles de verre sont ensemencés dans le milieu qui convient le mieux au développement du microbe envisagé. On peut également faire une inoculation à l'animal le plus réceptif pour le microbe en expérience, absolument comme lorqu'on étudie l'influence de la dessiccation sur les divers organismes (*ubi supra*). Si on a fait usage des grenats, il vaut mieux opérer autrement (Krönig et Paul); on agite ces grenats dans des volumes égaux d'eau stérile et pendant

des temps égaux ; ils abandonnent alors à l'eau des quantités sensiblement égales de germes. Cette eau sert à faire des plaques ou des inoculations.

2° Produits liquides. — Les opérations de contrôle ne présentent à mentionner aucune particularité spéciale.

D. *Remarques.*

L'action des antiseptiques varie, non seulement suivant la nature du désinfectant, suivant sa concentration, la durée de son action et la température, mais encore, suivant la nature des germes, leur nombre et la composition du milieu qui les contient. Ce dernier point est très important ; M. Behring a montré, en effet, que le sublimé détruit, par exemple, la bactéridie dans l'eau au 500000e; dans le bouillon au 40000e et dans le sérum (inconstamment d'ailleurs) au 2000e. Il faut enfin tenir compte du véhicule dans lequel on dissout l'antiseptique. Presque toujours on devra s'adresser à l'eau ; l'alcool et la glycérine seront rejetés le plus souvent, les corps gras constamment.

2° **Antiseptiques gazeux ou volatils.**

On doit à M Miquel des recherches fort complètes sur la désinfection des poussières sèches par les gaz ou les vapeurs. Comme test-objets, M. Miquel emploie des poussières finement tamisées, qu'il répartit en couches toujours égales sur des lames de platine stériles, et des spores charbonneuses sèches, qu'il prépare comme il suit. On stérilise par le flambage un flacon contenant des perles de verre et de la poudre de silice très fine. On verse dans ce flacon une culture charbonneuse riche en spores et on agite pour obtenir une pâte homogène. La pâte est desséchée à 30°, en faisant circuler dans le flacon un courant d'air filtré et privé

de vapeur d'eau par passage sur le chlorure de calcium. Cette opération demande 10 à 12 jours. On réduit, par agitation, cette pâte en poussière et on la conserve dans un flacon stérile. Au moment du besoin, on en prélève des quantités égales, à l'aide d'une cuillère de platine.

L'exposition aux gaz ou aux vapeurs a lieu sous des cloches de 7 à 20 litres de capacité, bien ajustées sur des plaques de verre épais. On note la température et la pression. On enlève, à un moment donné, les poussières, avec lesquelles on pratique des numérations ou des inoculations. On examine toujours comparativement des poussières témoins, pour éliminer l'influence de la dessiccation. Lorsque, parallèlement, on désire se rendre compte de l'action des gaz et des vapeurs sur divers objets qui entrent dans la composition des mobiliers (étoffes, papiers peints, métaux, etc...), il suffit d'en placer sous les cloches de petits échantillons. On examine ensuite s'ils sont ou non altérés.

II. *Production expérimentale des formes involutives, de l'asporogénie et de la perte des cils.*

1° **Formes involutives.** — On arrive sans peine à produire des formes involutives, en laissant vieillir les cultures ou en les soumettant à diverses influences hostiles : températures extrêmes, milieux trop riches ou trop pauvres, milieux acides ou très alcalins, milieux additionnés d'un excès de sel marin, d'antiseptiques (fig. 115), etc. La production de formes involutives caractéristiques peut aider à identifier un microbe. Ainsi, on a conseillé, pour le diagnostic du bacille de Yersin, de recourir soit à la gélose salée à 2-4 pour 100 (Hankin) soit à la gélose desséchée, soit encore au bouillon phéniqué (Löffler). Le bacille

pesteux offre alors des aspects monstrueux : formes de levûres ou de protozoaires, bacilles irréguliers et se teintant inégalement etc...

2° **Asporogénie.** — Nous ne voyons à signaler que les procédés employés vis-à-vis de la bactéride charbonneuse. MM. Chamberland et Roux (1883) cultivent le b. anthracis dans des bouillons additionnés de 1/2000e de bichromate de potasse. A partir du 8e jour, les cultures filles ne donnent plus de germes. Ces bacilles aspo-



Fig. 115. — Variations morphologiques du b. pyocyanique sous l'influence des antiseptiques.

rogènes tuent parfaitement le cobaye, mais ils sont très fragiles et leur vitalité maxima n'excède guère 30 à 40 jours. Par précaution, nous conseillons de les repiquer tous les 15 jours au plus tard. En 1890, M. Roux a fait connaître un nouveau procédé. Il cultive la bactéridie charbonneuse en bouillon phéniqué à 6-10 pour 10000 ; l'asporogénie est obtenue en 8 à 10 jours. M. Behring (1891) s'est adressé à la gélatine acidifiée par l'acide rosolique ou l'acide chlorhydrique à 1 pour 100. M. Phisalix (1893) conseille de faire des cultures en série à 42°

et de repiquer tous les cinq jours ; après 5 ou 6 passages la transformation est réalisée. MM. Surmont et Arnould (1894) ont noté que tous les virus charbonneux ne se laissent pas modifier avec une égale facilité et que la virulence joue un rôle important. Pour eux, le meilleur moyen consiste à partir du premier vaccin et à le cultiver d'abord à 42°, puis à 37° en présence d'acide phénique. Ce procédé mixte donne d'excellents résultats. Revenant enfin tout récemment sur la question, M. Phisalix a indiqué les trois moyens suivants : culture en sac de collodion dans le péritoine du chien (on se servira avec avantage du sérum de chien comme milieu nutritif) ; ensemencement des ganglions inguinaux d'un chien inoculé sous la peau de la cuisse ; cultures successives en sérum de chien. La méthode la plus sûre serait la première.

Nous rappellerons que l'on constate la présence de spores dans un liquide, en chauffant celui-ci 20 minutes à 90° dans une ampoule scellée et en ensemençant ensuite. Le résultat se montre positif quand il existe des formes de résistance (Pasteur).

3° **Perte des cils.** — Une espèce microbienne cesse parfois spontanément de former des cils. C'est ce que l'un de nous a constaté jadis pour le vibrion de Koch, entretenu depuis très longtemps à l'Institut Pasteur. Le changement de milieu peut jouer un rôle important dans cette transformation. C'est ainsi que M. Löffler cite un organisme, isolé de l'infusion de chou-rave, qui ne possède ses flagella que dans les milieux au chou-rave et les perd dans les milieux courants. La culture à haute température n'atteint que transitoirement la fonction motrice ; d'après M. Ferrier, le colibacille et le subtilis ne produisent point de cils à 46°, mais, reportés vers 35°, ils en forment à nouveau. Il faut combiner la cha-

leur et les antiseptiques pour amener la perte de toute mobilité. M. Villinger, cultivant le coli-bacille à 45 dans le bouillon phéniqué, a obtenu en effet, après plusieurs passages, des races définitivement immobiles.

CHAPITRE IV

POISONS MICROBIENS

Les microbes pathogènes agissent sur l'organisme par les poisons qu'ils sécrètent. Le plus souvent cette sécrétion se manifeste dans l'organisme même, les microbes étant à la fois toxigènes et parasites. Il existe cependant des espèces purement toxigènes, c'est-à-dire incapables d'infecter l'homme et les animaux et susceptibles cependant d'élaborer, au sein des milieux favorables, des toxines parfois très actives : tel le bacillus botulinus de M. van Ermengem. D'autre part, le b. tétanique, qui sécrète un poison redoutable, ne pousse qu'à peine *in vivo*.

Les toxines prennent naissance au sein de la cellule microbienne, d'où elles diffusent ou non suivant les cas. Il en résulte que les liquides de culture des microbes pathogènes sont loin de se montrer toujours nuisibles. Il en est de même pour les humeurs et les macérations d'organes filtrées. Dans ce dernier cas, le poison reste fixé, non seulement au corps même des microbes, mais aussi aux éléments anatomiques.

Nous distinguerons les *toxines solubles* et les *poisons du corps des microbes*.

1° TOXINES SOLUBLES

Nous décrirons séparément : 1° les *toxines* solubles *types* ; 2° la *malléine* et la *tuberculine*, qui sont

de véritables extraits des corps microbiens; 3° les *leucocidines* et *hémolysines* d'origine bactérienne, qui représentent des poisons très spéciaux.

A. Toxines solubles types.

L'analogie des toxines solubles et des diastases est bien connue. Comme les enzymes, les toxines agissent à des doses très faibles, se dissolvent dans l'eau et la glycérine, dialysent très lentement et sont affaiblies par la filtration. Elles se montrent sensibles à la chaleur, à la lumière, à l'oxydation, aux changements de réaction, à divers agents chimiques. Elles résistent bien mieux à l'état sec qu'à l'état de solution. Elles adhèrent aux précipités et coagulums produits dans les liquides où elles ont pris naissance et se fixent sur les corps les plus variés, en vertu d'un véritable phénomène de teinture. Les poisons microbiens ont leurs analogues dans les toxines végétales (abrine, ricine), et animales (venins, principe actif du sérum d'anguille), bien différentes des alcaloïdes et des ptomaïnes.

De nombreuses causes influent sur la sécrétion des toxines. Les unes se rapportent aux microbes. Pour obtenir des poisons énergiques, il faut s'adresser à des organismes très virulents, ou bien, s'il s'agit de microbes incapables d'un développement marqué chez les êtres vivants, il faut faire faire à la race la plus toxigène des passages successifs dans le milieu d'élection, jusqu'à ce qu'elle y offre sa croissance maxima.

Les milieux de culture ont donc une importance considérable. Les sels minéraux sont naturellement nécessaires, mais il convient parfois de les employer à dose plus élevée que s'il s'agissait de cultures ordinaires. Les sucres se montrent souvent nuisibles, à cause de la production d'acides. L'azote albuminoïde

est indispensable, sous la forme de peptones. D'ordinaire, le milieu doit être et rester alcalin. Mais si la basicité devient trop forte, le poison ne tarde pas à s'en ressentir.

La température optima oscille habituellement autour de 37°. L'aération joue un rôle important, vis-à-vis des organismes susceptibles de donner des voiles superficiels. Toutefois, si dans les cultures en couche mince et en large surface les poisons apparaissent vite, ils disparaissent vite également, détruits par une oxydation trop intense.

Ce qui précède a trait aux cultures liquides. Lorsqu'on fait macérer le dépôt formé, sur les milieux solides, par des pathogènes susceptibles de sécréter des toxines solubles, on s'aperçoit que la macération est peu active. Il semble que là où le poison ne peut diffuser, son élaboration se réduit au minimum. Enfin, d'une façon générale, plus un microbe envahit facilement le corps des animaux et plus sa fonction toxigène semble faible.

Nous allons indiquer le mode de préparation et rappeler les caractères essentiels des principales toxines solubles.

1° **Poison botulique.** — On sait que, très différent des accidents gastro-intestinaux, engendrés par des bactéries plus ou moins voisines du bacillus enteriditis de Gärtner, le botulisme est causé par une toxine extrêmement active, sécrétée dans les viandes par le bacillus botulinus de van Ermengem. On peut préparer cette toxine par macération des viandes botuliques dans l'eau; on filtre, ou bien on additionne d'antiseptiques. Comme on n'a que rarement de telles viandes à sa disposition, on recourt d'ordinaire à la culture, laquelle donne d'ailleurs un poison plus énergique. On choisit, comme milieu électif, la viande de porc hachée, additionnée de sel (1 pour 100), de

peptone (1 pour 100), de gélatine (2 pour 100) et de glucose (1 pour 100) ; il faut alcaliniser assez fortement. La culture se fera à l'abri de l'air et entre 20° et 30°. Les filtrats (toujours acides) tuent la souris à une dose inférieure à un cinq millionnième de centimètre cube.

La toxine est détruite par la soude à 0,5 pour 100 en cinq minutes, et la neutralisation ne fait pas reparaître l'activité. Elle est affaiblie après 3 heures à 58° et disparaît vite à 100°. La dessiccation rapide à 37° se montre inoffensive. Le poison résiste, (24 heures) à 35°, aux acides lactique et tartrique (3 pour 100) et même à l'acide chlorhydrique (1 pour 1 000). Il est entraîné par l'alcool et le sulfate d'ammoniaque. Enfin il se fixe sur certaines substances, en premier lieu la pulpe nerveuse ; $0^{cc},1$ d'émulsion cérébrale ou $0^{cc},3$ d'émulsion de moelle de cobaye neutralisent 3 doses mortelles pour la souris. Si on centrifuge le mélange de culture filtrée et de substance nerveuse, le liquide clair se montre inactif (Kempner et Schepilewsky). Le beurre fixe parfois la toxine, l'huile la fixe mieux (Kempner et Schepilewsky). La lécithine et la cholestérine neutralisent toujours le poison, l'antipyrine également.

2° **Poison tétanique.** — Un bon milieu pour l'obtention de la toxine tétanique est représenté par le bouillon peptonisé (1 pour 100), salé (2 pour 100), gélatiné (10 pour 100) et glucosé (1 pour 100) (Marie). M. Vaillard se sert de bouillon peptonisé et glucosé sans gélatine. Après 20 jours, il filtre et réensemence ; 18 jours après, il ajoute un peu de bouillon neuf et réensemence encore ; 16 jours plus tard, il obtient un poison très actif, tuant le cobaye à la dose de $1/10^3$ de c. m. c. et la souris à la dose de $1/10^5$. M. Brieger recommande d'alcaliniser le bouillon avec du carbonate de magnésie au lieu de carbonate de soude ; il conseille

aussi d'ajouter du gypse aux cultures, afin de transformer en sulfate d'ammoniaque inoffensif le carbonate d'ammoniaque formé, qui altère rapidement la toxine. On peut cultiver également le bacille de Nicolaïer en bouillon Martin. Au bout de cinq jours, on obtient le maximum de toxicité (Martin).

Toutes les cultures précédentes se font à l'abri de l'air. M. Debrand est arrivé, comme nous l'avons dit précédemment, à faire croître le bacille du tétanos à l'air libre en présence du b. subtilis, sans lui faire perdre son aptitude toxigène. Le procédé Debrand nous paraît représenter désormais la méthode de choix. Grâce à elle, l'un de nous, avec le Dr Zia-bey, a pu obtenir en 5 jours une toxine qui tue le cobaye au vingt-millième de c. m. c.

Quelle que soit la technique employée, il faut savoir que la toxine ne se conserve bien qu'au contact des microbes; on filtrera donc, au fur et à mesure du besoin, la quantité de culture nécessaire. On peut aussi recourir à la dessiccation, après concentration préalable; on entraîne alors le poison (avec les albumoses du milieu à l'aide du sulfate d'ammoniaque à saturation, on dessèche et on conserve dans le vide et à l'abri de la lumière. Il est inutile de dialyser, à cause de l'activité énorme du poison. On inocule en effet celui-ci) à doses si minimes, qu'il n'y a pas à tenir compte des traces de sulfate d'ammoniaque qui lui restent mélangées.

La toxine tétanique disparaît en 3 heures à 80°. Elle est sensible à l'air et à la lumière. La solution iodo-iodurée et l'antipyrine l'affaiblissent considérablement (Vaillard). Si on verse un peu de chlorure de calcium dans une culture en bouillon filtrée, on fait naître des nuages de phosphate de chaux qui entraînent partiellement le poison. Celui-ci peut du reste se fixer sur les corps les plus dissemblables,

par exemple le carmin (Stoudensky) et la substance nerveuse (Wassermann et Takaki).

Si on ajoute, à une émulsion de carmin dans l'eau physiologique, une proportion convenable de toxine tétanique, le mélange se révèlera inoffensif. Toutefois, à la suite d'une macération prolongée, on verra le poison abandonner peu à peu la matière colorante. Le carmin chauffé à l'état humide vers 60°, ou préalablement macéré, ou encore alcalinisé, perd sa curieuse propriété.

Si l'on ajoute, à une émulsion de substance nerveuse en eau physiologique, une dose déterminée de toxine tétanique, le mélange devient encore ici inactif. Il faut s'adresser au névraxe des mammifères et surtout au cerveau. M. Danysz a fait voir que si le cerveau, émulsionné dans l'eau physiologique, fixe par exemple 10 doses mortelles de poison, il n'en fixe que 9 dans l'eau distillée et une dans l'eau salée à 10 pour 100. Le véhicule a donc une grande importance; l'état de la substance nerveuse également, puisqu'après ébullition dans l'eau distillée elle perd les neuf dixièmes de son affinité pour la toxine.

Certains auteurs auraient constaté la présence du poison spécifique dans le sang des tétaniques. En injectant à une souris 2 à 3 centimètres cubes de ce sang, on pourrait même, d'après M. Kartulis, faire le diagnostic du tétanos. Il semble cependant que la toxine diffuse bien lentement *in vivo* et qu'au cours de cette diffusion, l'économie en fixe et en élimine la majeure partie (Marie).

3° **Poison du vibrion septique.** — La sérosité péritonéale et le suc musculaire filtrés des animaux infectés sont nettement toxiques (Roux), mais cette toxicité ne se montre jamais bien forte. M. Besson obtient une meilleure toxine, en cultivant le vibrion de la façon suivante. On met, dans un flacon, un

kilogramme de viande hachée, additionné de 15 centimètres cubes de solution de soude à 1 pour 100. On stérilise ; on ensemence ; on fait le vide et on place à l'étuve à 37° ; au bout de 20 heures, la viande est devenue rose vif et des bulles de gaz se dégagent. A la fin du deuxième jour, on donne issue à ces gaz, qui gêneraient le développement ultérieur de la culture. Le maximum de toxicité est obtenu le 6e jour. Le suc, exprimé et filtré, tue le cobaye par injection intrapéritonéale à la dose de 10 centimètres cubes.

MM. Leclainche et Morel préfèrent ensemencer le vibrion dans du bouillon Martin. Comme les cultures perdent leur activité par la filtration, ils les décantent; 5 centimètres cubes tuent le lapin dans les veines au bout de 10 à 60 minutes ; 5 à 6 gouttes le tuent dans le cerveau en 2 heures.

La toxine du vibrion septique est sensible à la lumière. Elle disparaît en 3 heures à 80°. La solution iodo-iodurée l'affaiblit peu (Besson).

4° **Poison du bacillus Chauvœi.** — Le poison du bacille du charbon symptomatique est très voisin de celui du vibrion septique. M. Dünschmann l'obtient à l'aide du procédé de la viande hachée. La toxicité maxima est acquise le 7e jour. On concentre le liquide filtré, dans le vide, à 32°, sur de l'acide sulfurique ; 1cc,5 tue le cobaye dans le péritoine.

MM. Leclainche et Vallée cultivent le b. Chauvœi en bouillon Martin. La plus grande toxicité se manifeste le 8e jour. La filtration affaiblit assez sensiblement le poison ; cependant certains filtrats, inoculés dans le péritoine à la dose de 5 centimètres cubes, tuent le cobaye en quelques heures. Une dose de 3 centimètres cubes, injectée dans les veines du lapin, le fait périr en quelques minutes.

La toxine du b. Chauvœi se montre fragile. Elle

est détruite en 3 heures à 80°. Une aération puissante la fait disparaître en 48 heures.

5° **Poison diphtérique.** — Pour préparer un poison énergique, il faut s'adresser à des races très actives et les accoutumer au milieu choisi. Celui-ci est représenté maintenant par le bouillon Martin, dont nous avons déjà donné un mode de fabrication rapide. La méthode suivante, plus lente, est préférable lorsqu'il s'agit d'obtenir une toxine très forte. 200 grammes d'estomac de porc haché sont mis à digérer, pendant 24 heures, à 50°, dans un litre d'eau, en présence de 10 centimètres cubes d'HCl à 16° Baumé. D'autre part, on fait macérer, pendant 24 heures, 500 grammes de viande hachée dans un litre d'eau (certains auteurs placent ensuite la macération pendant quelques heures à l'étuve, pour lui faire subir un début de putréfaction, qui détruit les sucres musculaires). Le digéré d'estomac est porté un quart d'heure à 95°, neutralisé, chauffé un quart d'heure à 80° et alcalinisé légèrement. La macération de viande est salée à 0,5 pour 100, alcalinisée, et mêlée à parties égales avec le digéré d'estomac. Puis on porte le tout un quart d'heure à 70° ; on filtre sur papier, puis sur bougie. Le bouillon Martin est alors prêt à servir. Notons qu'il doit être alcalin au tournesol et acide à la phénolphtaléine. L'alcalinité optima s'obtient en ajoutant à un litre de bouillon, neutre au tournesol, 7 centimètres cubes de la solution normale de soude (Martin). Le bouillon Martin sera disposé en couche mince (3-4 centimètres de haut) dans des flacons à large base. Il est inutile de faire passer un courant d'air, comme dans le procédé initial de MM. Roux et Yersin. Au bout de 24 à 36 heures, un voile apparaît à la surface du bouillon. Il tombe le troisième jour et se reforme jusqu'au sixième ; il tombe alors définitivement.

La culture devient alcaline à la phénolphtaléine du deuxième au quatrième jour. Le maximum de toxicité est atteint après 5 jours ; à ce moment, la culture est active au 200e de centimètre cube pour le cobaye. Le dixième jour, l'activité est déjà diminuée. On peut concentrer la toxine en la précipitant par le sulfate d'ammoniaque, mais il faut ensuite dialyser pour se débarrasser de celui-ci, ce qui complique notablement les choses, puisqu'on doit opérer aseptiquement.

Pour M. Théobald Smith, le meilleur milieu est le bouillon privé de sucre par fermentation (ensemencement de coli-bacilles), auquel on ajoute ensuite 0,1 pour 100 de glucose. Le bacille diphtérique posséderait la propriété de neutraliser bien mieux les acides formés par la décomposition du glucose que ceux engendrés par la fermentation des sucres musculaires. Divers auteurs conseillent aussi de ne pas rechercher systématiquement l'absence de sucre dans les milieux. Il y a là évidemment une question de nature et de dose des sucres.

La toxine diphtérique est détruite en 20 minutes à 100°. L'air et la lumière l'altèrent facilement, la lumière seule se montre moins dangereuse. Les acides diminuent la toxicité et celle-ci ne reparaît jamais complètement par neutralisation. Le phénol, le biborate de soude font fléchir légèrement l'activité; l'antipyrine et la solution iodo-iodurée davantage.

6° **Poison cholérique.** — On peut prouver son existence, en cultivant les vibrions en sac dans le péritoine des cobayes. Les animaux succombent alors avec tous les signes de l'intoxication cholérique. Des passages en sac sont également nécessaires, si l'on veut augmenter la virulence et le pouvoir toxigène du vibrion de Koch. Pour démontrer l'existence de la toxine cholérique, on peut aussi inoculer les humeurs

filtrées des cholériques (Bosc), ou le contenu intestinal filtré des jeunes lapins atteints de l'affection expérimentale (Metchnikoff). Ces derniers liquides sont toutefois moins toxiques que le poison des cultures. On obtient celui-ci en ensemençant le contenu d'un sac dans l'eau peptonisée (2 pour 100), salée (1 pour 100) et gélatinée (2 pour 100). L'ensemencement se fait dans un flacon, puis, après quelques heures d'étuve, on répartit dans des boîtes de Petri, car il faut cultiver en couche mince. Le voile apparaît au bout de 12 heures. Au troisième ou au quatrième jour, la culture est devenue très alcaline et dégage une odeur spéciale. La toxicité offre alors son maximum ; elle diminue ensuite, au fur et à mesure que l'alcalinité et l'odeur augmentent. La toxine cholérique tue 100 grammes de cobaye sous la peau, à la dose d'un tiers de centimètre cube. Le poison est peu sensible à l'ébullition, mais l'air et la lumière l'affaiblissent (Metchnikoff, Roux et Salimbeni).

7° **Poison pyocyanique.** — La toxine pyocyanique s'obtient en cultivant un virus de passage dans du bouillon nettement alcalin et peptonisé à 2 pour 100. On met à l'étuve à 37° et on agite plusieurs fois par semaine. Après 40 jours, on recouvre la culture de toluol, afin de stériliser les germes et on conserve à la température ordinaire, en agitant fréquemment. Au bout d'une semaine, les germes sont morts et le liquide se montre très toxique. L'inoculation intrapéritonéale amène la mort du cobaye à la dose de $0^{cc},5$; cependant, il existe d'un flacon à l'autre de grandes différences d'activité. La température de 100° altère très rapidement le poison pyocyanique (Wassermann).

8° **Poison typhique.** — M. Chantemesse a donné deux procédés pour l'obtenir. Une première méthode consiste à cultiver le bacille d'Éberth (renforcé) dans

une macération de rate, additionnée d'un peu de moelle des os et de sang humain défibriné. La culture se montre très riche. Au bout de 24 à 36 heures, il se forme un voile à la surface du liquide et celui-ci devient très alcalin. Le maximum de toxicité est obtenu le cinquième ou le sixième jour. Du douzième au quinzième, le poison disparaît.

Un deuxième procédé consiste à cultiver dans une solution de peptone de rate (rate digérée par l'estomac de porc) un b. typhique très virulent, ayant séjourné 24 heures en sac de collodion dans le péritoine du lapin. Il faut aérer fortement. La végétation est riche et le voile marqué. De même qu'avec la méthode précédente, la toxine n'augmente plus après 5 à 6 jours. Un centimètre cube de culture filtrée, injectée dans le péritoine, peut tuer 80 grammes de cobaye. Le poison craint l'air, la lumière, la concentration. Il fléchit vite à 100°, mais résiste une heure à 58°. Il est retenu par le noir animal. L'acide tartrique l'atténue ; toutefois l'activité reparaît après neutralisation.

9° **Poison pesteux.** — On cultive en bouillon gélatiné (0,5 pour 100) un bacille de Yersin très virulent, puis on laisse macérer sous le toluol. Le liquide filtré, précipité au moyen du sulfate d'ammoniaque, donne une poudre susceptible d'amener la mort des souris au quart de milligramme. La toxine s'altère déjà à 70° (Roux).

10° **Poison charbonneux.** — On fait usage d'une solution qui contient, pour un litre d'eau, 40 grammes de peptone pure (sans albumoses), 40 grammes de glycérine, 15 grammes de sel, $0^{gr},5$ de phosphate de potasse et $0^{gr},2$ de phosphate de soude. On cultive vers 20°, et on isole la toxine à l'aide de procédés assez délicats. Cette toxine se montre active vis-à-vis de divers animaux. Elle s'affaiblit à 100°. Elle est

détruite par l'insolation, le chlorure de chaux, les hypochlorites, le chlorure d'or, la solution iodo-iodurée (Marmier).

11° **Poison pneumococcique.** — Les cultures ou macérations d'organes filtrées sont, en général, peu actives.

12° **Poison du choléra des poules.** — Pasteur a fait voir que les cultures filtrées reproduisent les signes caractéristiques de la maladie, quand on les injecte aux poules.

13° **Poison streptococcique.** — M. Marmier l'a préparé en recourant à son milieu (*ubi supra* ; poison charbonneux). M. Marmorek conseille de cultiver le streptocoque en bouillon sérum et de filtrer après 3 mois. On arrive alors à tuer le lapin en 3-4 jours à la dose d'un centimètre cube de filtrat. Il recommande également d'ajouter, de temps en temps, de l'extrait de viande à des cultures en bouillon, pour prolonger le développement microbien et augmenter la toxicité du milieu.

14° **Poison du bacille de Pfeiffer.** — MM. Delius et Kolle emploient le procédé suivant. On verse 50 centimètres cubes de bouillon dans un flacon à large fond ; la couche de bouillon doit avoir environ trois quarts de centimètre d'épaisseur. On ajoute un quart à un demi-centimètre cube de sang de pigeon défibriné et on mélange intimement. On laisse plusieurs heures au froid, pour laquer les hématies et on ensemence. Les cultures filtrées sont toxiques vers le huitième jour, mais il faut inoculer 8 centimètres cubes si l'on veut tuer le cobaye dans le péritoine. La toxicité disparaît vite, même à basse température.

B. Malléine et tuberculine.

La malléine et la tuberculine sont réellement des

extraits microbiens et non des toxines types (au sens où nous avons pris ce mot). Leur action n'en est pas moins spécifique.

1° **Malléine.** — MM. Roux et Nocard la préparent à l'aide du procédé suivant. Ils se servent d'un bacille morveux très virulent, entretenu par passage chez les lapins (inoculations intraveineuses). Ils ensemencent, avec le sang de ces animaux, du bouillon glycériné à 4 pour 100, réparti dans des ballons, à raison de 250 centimètres cubes par ballon. Après un mois de séjour à 38°,5, ils stérilisent quelques minutes à 110° ou une demi-heure à 100°, concentrent au dixième dans le bain-marie, filtrent sur papier Chardin et obtiennent ainsi la « *malléine brute* », qui présente une odeur vireuse tout à fait spéciale.

A l'Institut de Charkow, on cultive le bacille de la morve sur des pommes de terre, qu'on immerge ensuite pendant 4 jours dans de l'eau glycérinée au demi. L'extrait hydro-glycériné est porté 30 minutes à 120° et filtré à l'appareil Chamberland.

M. Foth prépare sa « malléine sèche » en partant d'un virus qui tue le chat en six à dix jours. Ce virus sert à ensemencer du bouillon glycériné ; après quelques semaines, on opère comme dans le procédé de MM. Roux et Nocard. La malléine brute, ainsi obtenue, est précipitée par 25 ou 30 volumes d'alcool absolu. Puis on dessèche le précipité dans le vide.

2° **Tuberculine.** — Pour la préparer, MM. Roux et Nocard cultivent le bacille de Koch en voile sur du bouillon glycériné à 4 pour 100, réparti dans des ballons, à raison de 250 centimètres cubes par ballon. Après 6 semaines de séjour à 38°,5, on stérilise à 110°, on concentre au dixième et on filtre sur papier Chardin. On obtient ainsi la « tuberculine brute », de tous points comparable à la malléine brute. Elle est aisément reconnaissable à son odeur de fleurs.

Nous devons dire un mot des diverses tuberculines de M. Koch. La « tuberculine purifiée » se prépare en précipitant la tuberculine brute par l'alcool et en desséchant, dans le vide, le précipité ainsi obtenu (la malléine sèche n'en est qu'une imitation). La « tuberculine nouvelle » est obtenue en desséchant les corps microbiens que l'on triture et additionne ensuite d'eau. On mélange intimement ; on centrifuge. Les liquides obtenus après le premier centrifugage sont additionnés de 20 pour 100 de glycérine.

D'après M. Krompecher, il faut de toute nécessité, lorsqu'on veut préparer une tuberculine active, s'adresser à un bacille tuberculeux virulent. Les bacilles dépourvus d'activité ou les bacilles de la tuberculose des poissons, donnent, au moins aux doses cliniques, une tuberculine absolument inactive.

C. Leucocidines et hémolysines d'origine microbienne.

1° **Leucocidines.** — Les leucocidines sont encore très mal connues. On sait seulement que le staphylocoque et le pyocyanique sont capables d'en sécréter. Le *staphilocoque doré,* injecté dans la plèvre des lapins, amène la production d'un exsudat riche en leucocytes, dégénérés pour la plupart. Si l'on fait agir cet exsudat sur des leucocytes normaux, il les altère rapidement. Le noyau des globules apparaît, puis le protoplasma se dissout et finalement le noyau est attaqué lui aussi. Les exsudats toxiques, chauffés vers 58°-60° pendant 10 minutes, perdent toute nocuité. D'après M. Bail, la leucocidine existe dans les cultures, mais elle est difficile à mettre en évidence. Quand on inocule le *b. pyocyanique* au cobaye, par la voie abdominale, l'exsudat obtenu contient, ici encore, beaucoup de globules blancs dégénérés. Cet exsudat est leucocide. Il en va de même pour les cultures du ba-

cille de Gessard, mais les cultures filtrées se montreraient inactives (Georghiewski).

2° **Hémolysines.** — La *tétanolysine* (Madsen) se trouve mêlée, en proportion variable selon les cas, avec la tétanospasmine, dans les cultures filtrées du b. tétanique. Elle dissout les hématies de divers animaux, surtout celles du cheval et du lapin. La tétanolysine disparaît plus vite que la tétanospamine par le vieillissement et le chauffage de la toxine brute. On se servira avec avantage, pour l'étudier, du poison tétanique desséché, où elle se conserve mieux.

La *pyocyanolysine* (Bulloch et Hunter) agit sur les hématies d'un grand nombre d'animaux. Pour la mettre en évidence, on a recours à des cultures en bouillon d'un b. pyocyanique très virulent. Après 3 ou 4 semaines, on filtre, ou bien on chauffe 15 minutes à 60°. Les liquides filtrés perdent leur activité après 15 minutes d'exposition à 100°, ce qui ne s'observe pas avec les cultures stérilisées par la chaleur.

La *staphylolysine* a été signalée par M. Neisser. Les cultures filtrées du staphylocoque doré, âgées de 9 à 13 jours, montrent une action dissolvante marquée sur les hématies de divers animaux et surtout du lapin.

2° POISONS DU CORPS DES MICROBES

Les microbes morts sont toxiques à des doses très variées ; 16 milligrammes de bactéries du choléra des poules tuent le cobaye (dans le péritoine) ; 4 milligrammes de bactéries de la pneumo-entérite des porcs tuent la poule (également dans le péritoine). Par contre, il faut injecter, sous la peau de la souris, le dépôt de 300 centimètres cubes de culture de rouget pour amener la mort (Voges). Les corps des microbes provoquent tantôt un empoisonnement aigu

ou lent, tantôt des abcès ou des granulomes. Les abcès se manifestent fréquemment quand on inocule des quantités croissantes sous la peau des animaux dans le but de les hyperimmuniser contre tel ou tel organisme (b. typhique ou vibrion cholérique par exemple). Les bacilles tuberculeux morts engendrent des tuberculoses types.

On a souvent cherché à extraire le poison du corps des microbes et, pour y parvenir, on s'est adressé tantôt à la macération, tantôt à l'expression. Ce dernier procédé est tout à fait exceptionnel. Le premier a parfois donné des résultats intéressants. Ainsi, M. Marmier prépare une toxine charbonneuse active en faisant digérer les bactéridies avec de l'alcool à 20°, additionné de quelques gouttes d'éther. D'autres savants utilisent la glycérine, d'autres encore les alcalis (*ubi infra*).

Quand on veut vacciner avec les poisons du corps des microbes, on se sert le plus souvent de cultures tuées par la chaleur ou les antiseptiques. On peut aussi recourir aux humeurs stérilisées, lorsque celles-ci sont riches en germes. C'est le cas pour le sang dans les septicémies et pour les exsudats après inoculation dans les séreuses.

Nous indiquerons, comme exemple de l'emploi des poisons du corps des microbes, la préparation de divers produits toxiques à l'aide du *bacille de la peste*. On peut tuer le b. de Yersin, en culture, par la chaleur et préparer ainsi un excellent vaccin (Haffkine). Par la chaleur également, on peut tuer le bacille de Yersin contenu dans l'exsudat péritonéal du lapin ou du cobaye (vaccin de Terni et Bandi). Enfin, dans le but d'immuniser les animaux, on peut fabriquer un extrait alcalin du bacille pesteux (Lustig et Galeotti). Étudions successivement ces différentes préparations.

A. Vaccin d'Haffkine.

On le prépare à l'aide d'un des trois procédés suivants :

a) *Procédé d'Haffkine.* — On ensemence le b. de Yersin dans des ballons de 2 litres, à moitié pleins de bouillon ; on a préalablement déposé à la surface de celui-ci un peu de beurre ou d'huile stérilisés. On cultive à 30°. Le bacille, en se développant, forme, à la surface des liquides, un voile d'où pendent des prolongements en stalactites. Cinq à six fois pendant un mois, on agite légèrement pour précipiter ces stalactites. Au bout du mois, on vérifie la culture ; on la répartit en tubes complètement pleins ; on scelle et on chauffe une heure à 70°.

b) *Procédé de Roux.* — M. Roux cultive le bacille de la peste sur gélose, dans des boîtes analogues à celles de Berthier. Au bout de 48 heures, il prélève le dépôt microbien, l'émulsionne dans de l'eau physiologique et chauffe une heure à 75°, en ballons scellés, dans un grand volume d'eau.

c) *Procédé de Calmette.* — M. Calmette cultive également le bacille de la peste sur de la gélose coulée dans des boîtes. Après 48 heures, il délaye dans 20 centimètres cubes d'eau le contenu de chacune de ces boîtes. Il filtre sur étoffe, puis sur papier. Il lave les bacilles demeurés sur le filtre, puis les prélève et les suspend dans un peu d'eau. Il chauffe ensuite une heure à 70° et sèche dans le vide. Les corps bacillaires, ainsi traités, ne donnent jamais, selon lui, d'abcès aux animaux.

B. Vaccin de Terni et Bandi.

MM. Terni et Bandi inoculent des cobayes ou des lapins avec une émulsion virulente de bacille de Yersin.

Ils les sacrifient pendant l'agonie, recueillent les exsudats et les diluent au besoin. Après un séjour de douze heures à 37°, séjour destiné à « enrichir » ces exsudats, ils les chauffent deux jours de suite à 50°-52°, pendant deux heures chaque fois. Ils les additionnent ensuite, suivant leur richesse, d'une quantité variable d'eau physiologique alcalinisée (0,5 pour 100 de carbonate de soude) et phéniquée (0,25 pour 100 de phénol). Avec l'exsudat d'un cobaye de 350 à 500 grammes, on peut obtenir en général 50 à 60 centimètres cubes de vaccin.

MM. Terni et Bandi établissent de la façon suivante le parallèle de leur vaccin et de celui d'Haffkine.

a) 1/10 centimètre cube de la lymphe d'Haffkine donne à un cobaye de 300 à 400 grammes une induration et un malaise transitoire ; la même dose donne au rat d'égout des troubles locaux et généraux encore moins marqués. Au contraire, 1/5 centimètre cube de vaccin Terni et Bandi n'amène chez le cobaye qu'une réaction locale et générale insignifiante et ne provoque rien chez le rat.

b) La lymphe d'Haffkine immunise le cobaye après douze jours seulement ; celle de Terni et Bandi après quatre jours.

c) Le vaccin d'Haffkine est susceptible d'accélérer un peu la mort, quand on l'inocule au cobaye pendant l'incubation de la peste. Le vaccin de Terni et Bandi reste sans effet dans ces conditions.

C. Extrait alcalin de Lustig et Galeotti.

MM. Lustig et Galeotti cultivent le bacille de Yersin sur gélose. Au bout de trois jours, ils raclent les cultures et font macérer les bacilles, pendant 12 ou 24 heures, dans une solution de potasse à 1 pour 100. Ils filtrent, étendent un peu et préci-

pitent par l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique dilués. Le précipité est ensuite dissous dans une solution de carbonate de soude à 0,5 pour 100 ; 5 à 8 milligrammes d'extrait tuent 100 grammes d'animal.

Nous retrouverons d'autres applications du poison du corps des microbes en parlant des vaccins de Ferran-Haffkine contre le choléra et ceux de Wright contre la fièvre typhoïde.

CHAPITRE V

MODIFICATIONS DE LA VIRULENCE. PRÉPARATION DES DIVERS VACCINS

On peut se proposer d'augmenter, de diminuer ou de conserver la virulence. Nous allons indiquer les principales méthodes qui permettent d'atteindre ces trois buts.

1° AUGMENTATION DE LA VIRULENCE

Pour augmenter la virulence d'un microbe pathogène, ou pour transformer en pathogène un organisme saprophyte (« création de la virulence »), on peut recourir à deux sortes de procédés, aux *passages* par les animaux, ou aux *cultures en sac* de collodion ou de roseau. Au point de vue de l'augmentation de la virulence, les sacs donnent d'ordinaire un renforcement plus rapide et surtout plus stable que les passages.

A. *Méthode des sacs.*

Les sacs de collodion ont été employés tout d'abord par M. Sanarelli, MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni en ont fait ensuite usage au cours de leurs recherches sur la toxine cholérique. M. Metchnikoff a montré qu'on pouvait les remplacer avantageusement par des sacs de roseau, plus perméables. Nous indiquerons successivement la préparation et le mode

d'emploi de ces deux sortes de sacs. Mais, auparavant, nous ferons remarquer qu'une culture en sac représente une véritable culture *in vivo*, au sens littéral du mot, car les microbes ensemencés peuvent se développer au sein des humeurs sans être exposés à l'action phagocytaire. La perméabilité du sac permet, en effet, l'apport des matériaux utiles aux microbes et le départ des substances nuisibles. Tout est donc réuni pour amener les germes à s'adapter au milieu animal choisi (saprophytes) ou à s'y mieux adapter (pathogènes déjà quelque peu actifs). Notons qu'il est souvent nécessaire de faire des passages en sacs.

Préparation des sacs.

a) **Sacs de collodion.** — On se sert de collodion ordinaire moyennement sirupeux, sans aucune addition d'huile de ricin ni de térébenthine, — et d'un tube de verre, arrondi régulièrement à une extrémité et d'un diamètre supérieur à celui du sac que l'on veut obtenir. Ce tube est trempé dans le collodion, l'extrémité fermée en bas, en évitant de produire des bulles. La partie plongée excédera, elle aussi, la longueur du sac (le collodion se rétracte en effet sous l'influence de la chaleur nécessaire à la stérilisation). On retire le tube; on fait égoutter le collodion, puis on trempe et on égoutte encore une ou deux fois, selon l'épaisseur que l'on désire obtenir. Finalement, on laisse sécher un peu, en imprimant au tube un mouvement de rotation pour répartir uniformément le collodion resté liquide. On sectionne circulairement la couche à demi molle près de l'extrémité supérieure du sac et on retourne celui-ci en doigt de gant. Pour y arriver, on refoule doucement le collodion au moyen du pouce et de l'index gauches, la main droite maintenant le tube de verre. Le sac retourné, on l'insuffle

et on l'adapte sur un agitateur. Ainsi soutenu, il est exposé à la vapeur d'eau bouillante puis trempé dans l'eau elle-même. Il se rétracte et prend ses dimensions définitives. On engage alors, dans sa partie ouverte, un anneau de verre rodé. On ajuste le collodion sur le verre à l'aide de plusieurs tours de fil bien serrés et on consolide la ligature en la recouvrant de collodion. Le sac est prêt; on le remplit d'eau et on le suspend, par un fil, dans un tube à essai contenant de l'eau à sa partie inférieure. On stérilise à l'autoclave. Une fois l'opération terminée, le sac se trouve régulièrement tendu. Si on ne veut pas s'en servir de suite, il faut le faire plonger dans le liquide du tube à essai pour éviter la dessiccation.

b) **Sacs de roseau.** — On prend des fragments de tiges de roseau commun, dont la membrane interne servira à faire les sacs. Ces fragments, convenablement choisis comme longueur et comme diamètre intérieur, sont mis à bouillir 1/4 d'heure dans l'eau lorsqu'ils sont frais, ou portés une heure à l'autoclave lorsqu'ils sont secs. On ramollit ainsi le roseau et on facilite le détachement de sa pellicule interne. On taille un des bouts, comme s'il s'agissait d'un crayon, en s'arrêtant à cette pellicule, qui est soigneusement dénudée sur une certaine longueur. On en lie l'extrémité et on la refoule doucement avec une baguette de verre jusqu'à ce que toute la membrane sorte par l'orifice non entaillé. On engage alors un petit tube de verre dans l'extrémité ouverte du sac et on lie solidement. On place, au-dessous du tube, une ligature d'attente et on stérilise à l'autoclave, en suivant les indications données dans le cas précédent.

Mode d'emploi des sacs.

a) **Sacs de collodion.** — On retire le sac de son

tube, à l'aide du fil qui le suspend ; on le maintient dans une pince par l'anneau de verre terminal ; on le libère du fil ; on le vide de l'eau intérieure et on le remplit du liquide préalablement ensemencé. Puis on le ferme avec un petit fosset de caoutchouc et on coupe celui-ci au ras du verre. Il est inutile de collodionner si le bouchon s'adapte bien. On met le sac, une fois prêt, dans un tube stérile couché sur la table, en attendant qu'on l'introduise dans le péritoine d'un animal (lapin, cobaye, rat). La laparotomie se pratique selon les règles que nous avons données. Chez les grands animaux (solipèdes, bovidés), on peut introduire le sac dans le péritoine par la voie vaginale et le retirer de même (Nocard et Roux).

b) **Sacs de roseau.** — On enlève le sac de son tube à essai etc..., on le remplit avec le liquide ensemencé et on serre la ligature d'attente. On tord ensuite le sac au-dessus de la ligature, en agissant sur le tube de verre. On met une goutte de gomme laque sur la partie tordue et on détache le tube. On met enfin une seconde goutte de gomme laque sur l'autre extrémité.

On laisse les sacs un temps variable dans le péritoine. Pour les microbes à développement rapide, 48 heures suffisent le plus souvent. Au fur et à mesure que le temps s'écoule, le sac offre de la tendance à s'enkyster. Après 8 jours, on peut déjà le trouver entouré d'une gangue fibrineuse, qui supporte des vaisseaux de néo-formation. Plus tard, il est inclus dans une poche conjonctive plus ou moins épaisse. Il existe d'ailleurs des différences d'une expérience à l'autre, au point de vue de la réaction engendrée par le sac. Tout dépend du temps pendant lequel il conserve sa mobilité dans la séreuse et du point où il va finalement se cantonner. Le sac étant enlevé, on en cautérise le fond s'il s'agit d'un sac de collodion,

une extrémité s'il s'agit d'un sac de roseau, et on puise à l'intérieur à l'aide d'une pipette.

Pour rendre pathogènes certains saprophytes, tels que le b. mégatherium et le b. mesentericus (Vincent), comme pour rendre saprophytes certains parasites stricts, tel que le microbe de la péripneumonie, découvert par MM. Nocard et Roux, les cultures en sacs représentent le procédé le plus sûr. Ils constituent également le meilleur moyen dont on dispose pour transformer la virulence d'un micro-organisme donné. C'est ainsi que M. Nocard a pu convertir le bacille de la tuberculose humaine en bacille aviaire en faisant des sacs dans le péritoine des coqs. Cette transformation toutefois ne s'est accomplie qu'à la longue ; il a fallu laisser pendant 4 mois les sacs dans le péritoine et opérer 3 passages.

B. *Passages.*

Ils se pratiquent, selon les cas, dans les veines, les séreuses, le cerveau, etc... ou même sous la peau. Entre chaque passage, on fait une culture avec le sang du cœur ou la lésion locale. Les milieux-sérum sont le plus souvent indiqués pour cette culture. Il va de soi qu'à mesure que le virus devient plus actif, on diminue la dose de culture inoculée.

A l'aide des sacs ou des passages, on obtient parfois une exaltation telle que le microbe « tue à l'unité », c'est-à-dire par introduction d'un seul germe dans l'organisme animal.

2° DIMINUTION DE LA VIRULENCE

On peut distinguer deux sortes de chutes de la virulence : l'une *transitoire, individuelle,* c'est l'*affaiblissement* ; l'autre, *définitive, héréditaire,* c'est l'*at-*

ténuation. Quand on affaiblit un microbe, les cultures filles reprennent l'activité originelle, quand on atténue le même microbe, elles conservent l'activité diminuée.

On sait que l'atténuation systématique des virus a été découverte par Pasteur et on connaît le parti merveilleux qu'il a tiré de ses recherches pour obtenir la vaccination de certaines maladies. Nous allons indiquer le mode de préparation des principaux vaccins courants, obtenus à l'aide de l'atténuation ou de l'affaiblissement *in vitro*, nous bornant à rappeler que, par les passages, on peut réaliser parfois aussi une diminution de la virulence. C'est ainsi que l'organisme du lapin atténue le bacille du rouget et celui du singe le virus rabique.

A. *Vaccins obtenus par le mécanisme de l'atténuation.*

Ce sont les *trois vaccins pastoriens* (choléra des poules, rouget et charbon) qui se préparent en soumettant les cultures à l'action combinée de la température et de l'oxygène de l'air.

Vaccins du choléra des poules. — Le bacterium pathogène, cultivé à 37° au large contact de l'air, perd graduellement son énergie. Après 3 semaines à un mois, les cultures tuent la poule en 2-3 jours seulement ; ensuite en 5-6 jours. Plus tard, leur inoculation n'est suivie que d'une escarre locale et de phénomènes généraux rapidement curables. L'animal se trouve alors vacciné contre une atteinte ou une inoculation ultérieures. Au bout de 2 ou 3 mois la culture meurt. En prélevant chaque jour (à partir d'un certain moment) des traces de la culture mère et en faisant des réensemencements, on peut réaliser une échelle de virulence dont deux échelons, convenable-

ment choisis, représentent d'excellents vaccins. Le premier vaccin ne tue plus la poule, mais il fait périr le lapin ; le second vaccin tue 2 ou 3 poules sur 10.

Les *vaccins du rouget* se préparent de la même façon.

Vaccins charbonneux. — La bactéridie est justiciable de l'atténuation pastorienne, mais à la condition d'employer un détour. On sait qu'elle forme des spores à 37°. Or celles-ci ne sont nullement atteintes par le séjour prolongé à l'étuve, quelle que soit l'aération. Elles opposent donc une résistance absolue à l'atténuation. Pasteur supprime leur ingérence en faisant ses cultures à 42°-43°, température incompatible avec la sporogenèse. Si (toujours à partir d'un certain moment) on réensemence quotidiennement un peu de la culture mère, on obtient encore ici une gamme de virulence, dans laquelle on cherchera les deux vaccins. Les cultures filles, végétant à 37°, donneront naissance à des spores. Il s'ensuit que les vaccins charbonneux fléchiront bien moins facilement que ceux du choléra des poules et du rouget, puisque les spores conservent exactement la virulence de la bactéridie dont elles proviennent. Il faut savoir que tous les virus charbonneux ne s'atténuent pas également et que, dans une même culture, tous les microbes ne faiblissent pas aussi vite. La culture fille d'aujourd'hui peut être moins atténuée que celle d'hier et on devra faire un grand nombre de prélèvements pour avoir une bonne échelle de virulence. Il nous a paru intéressant de rapporter ici le protocole d'une expérience de Pasteur, pour montrer comment se produit l'atténuation de la bactéridie. Le 28 janvier 1881, Pasteur met en culture, à la température de 42°,5, un échantillon de virus charbonneux. La culture mère, examinée le 9 février (12 jours plus tard), ne tue plus le cobaye adulte. La

même culture, examinée le 28 février (31[e] jour), ne tue plus que de très jeunes souris. Le 12 mars (44[e] jour) elle se montre tout à fait dépourvue de virulence.

Le premier vaccin courant, obtenu après 15 ou 20 jours, ne tue ni le cobaye ni le lapin. Il est inoffensif pour le mouton, auquel il donne seulement parfois un peu de fièvre. Il tue la souris.

Le deuxième vaccin, obtenu après 10 à 12 jours, tue le cobaye et la souris. Il tue le tiers ou le quart des lapins inoculés. Enfin il peut amener la mort des moutons.

Il faut savoir que les vaccins sont susceptibles de baisser un peu à la longue, le premier vaccin principalement. On les remonte en passant par la souris. Les vaccins charbonneux donnent des cultures plus maigres que le virus virulent et résistent moins bien que lui aux influences nuisibles. Ils sont moins protéolytiques (ils ne coagulent pas le lait), mais par contre plus amylolytiques (Malfitano, Napias).

B. *Vaccins obtenus par le mécanisme de l'affaiblissement.*

Nous étudierons tout d'abord le vaccin antirabique, puis celui du charbon symptomatique.

Vaccin antirabique.

Du virus rabique fixe, tuant les lapins en dix jours, est entretenu par passages sous la dure-mère. Aussitôt après la mort de l'animal, on enlève avec soin la moelle épinière et on la suspend dans un flacon muni d'une tubulure inférieure et au fond duquel on a déposé de la potasse. Cette disposition permet de laisser passer sur la moelle un courant d'air dessé-

ché. Les flacons sont maintenus dans une étuve obscure, réglée à 23°. La virulence des moelles s'affaiblit peu à peu, sous l'influence de la dessiccation. Au bout de 14 jours, on peut les utiliser pour commencer la vaccination. On continuera ensuite le traitement par les moelles de 13, de 12, de 11 jours, et ainsi de suite, en injectant finalement la moelle de trois jours. C'est en général au 6e jour que les moelles cessent d'être virulentes. Il est toutefois à cette règle quelques exceptions. Ainsi, M. Roux a vu que des moelles du 12e jour, injectées dans les veines à dose massive, provoquaient parfois la rage chez le chien, alors que d'autres moelles, moins âgées (du 6e ou du 8e jour par exemple), n'étaient plus assez virulente pour conférer la maladie dans les mêmes conditions. Lorsque les animaux d'une même série sont de taille différente, les moelles, inégalement volumineuses, se dessèchent inégalement et la virulence ne décroît plus par degrés réguliers. C'est pour parer à ces inconvénients que M. Högyes a imaginé sa méthode de vaccination basée, sur la dilution.

Bien que ce procédé n'ait rien à voir avec l'affaiblissement de la virulence, il convient de le citer ici, à titre de comparaison. Voici comment on opère.

On prélève sur le bulbe d'un lapin, tué par le virus de passage, un gramme de substance nerveuse que l'on réduit, avec les précautions d'asepsie ordinaires, en une pulpe très fine. On ajoute, en broyant toujours, de l'eau physiologique jusqu'à concurrence de 100 parties pour une partie de bulbe. On étend ensuite à $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{500}$, $\frac{1}{1\,000}$, $\frac{1}{10\,000}$, etc., suivant les cas. M. Högyes a étudié l'activité de ces dilutions et établi un tableau comparatif entre elles et les moelles desséchées. La dilution à $\frac{1}{10\,000}$ ne tue plus le lapin ;

la dilution à $\frac{1}{5\,000}$ ne lui donne pas sûrement la rage ; lorsque celle-ci survient, c'est toujours après une incubation très longue. Les dilutions plus faibles provoquent des incubations de plus en plus courtes. De $\frac{1}{10\,000}$ à $\frac{1}{8\,000}$, les dilutions correspondent à la série des moelles du 11[e] au 8[e] jour. La dilution à $\frac{1}{5\,000}$ équivaut à la moelle du 7[e] jour. Les dilutions à $\frac{1}{1\,000}$, à $\frac{1}{500}$ et à $\frac{1}{200}$ correspondent aux moelles des 6[e], 5[e], 4[e] jours, etc.

Vaccin du charbon symptomatique.

a) **Procédé Arloing, Cornevin et Thomas.** — Des fragments de tumeurs charbonneuses sont triturés dans un mortier avec un peu d'eau. On filtre sur mousseline; on étale en couche mince dans des assiettes plates et on sèche à 37°. On obtient ainsi la « poudre Arloing ». Celle-ci conserve plus de 2 ans son activité. Pour fabriquer les vaccins, on mêle une partie de poudre à deux parties d'eau. On obtient le premier vaccin en chauffant 7 heures à 100°-104° et le second en chauffant à 90°-94° pendant le même laps de temps. Il faut opérer en couche mince et dans une étuve sèche.

MM. Leclainche et Vallée ont déterminé très exactement la virulence des vaccins Arloing. 6 à 8 centigrammes du premier vaccin, inoculés sous la peau du cobaye, ne le tuent pas ou le tuent à la longue par cachexie. 2 centigrammes du second vaccin le tuent presque toujours; selon les cas, la mort survient en 2 à 12 jours; à l'autopsie, on

constate dans les lésions la présence de microbes étrangers, ce qui tient au mode de préparation des vaccins. Aussi y a-t-il avantage à fabriquer des produits purs. C'est ce que MM. Leclainche et Vallée se sont proposé de faire.

b) **Procédé Leclainche et Vallée**. — On peut s'adresser soit aux humeurs, soit aux cultures.

Emploi des humeurs. — Le sang du cœur des animaux inoculés contient presque toujours le b. Chauvœi à l'état de pureté. On le recueille dans des ampoules, que l'on remplit complètement, puis on porte 48 heures à l'étuve, afin d'obtenir des spores. On répartit ensuite en couche mince dans des boîtes de Petri stériles et on dessèche à l'étuve pendant 3-4 heures. On triture enfin la poudre obtenue avec de l'eau stérile et on chauffe en couche mince pendant 7 heures à 102° (premier vaccin) et pendant 7 heures à 92° (second vaccin).

Lorsqu'on désire fabriquer une grande quantité de vaccins purs, on ensemence du sang de cheval et on cultive à l'abri de l'air. Le b. Chauvœi ne tarde pas à liquéfier ce sang et le liquide obtenu est traité comme précédemment.

Le premier vaccin de MM. Leclainche et Vallée, inoculé sous la peau, tue un cobaye de 100 grammes à la dose de 10 centigrammes. Le second vaccin, dans les mêmes conditions, est mortel à la dose de 5 centigrammes. A l'autopsie, on ne constate jamais la présence d'impuretés.

Emploi des cultures. — On cultive le bacterium Chauvœi en bouillon Martin ; au bout de 5 à 8 jours, on chauffe les cultures à 70° pendant 2 heures et on obtient ainsi le premier vaccin. Le second vaccin est représenté par la culture non chauffée. Deux centimètres cubes du premier vaccin sont parfaitement supportés par les bovidés, sans réaction locale, en

région défendue. Les animaux résistent ensuite, toujours sans réaction locale, à une inoculation de 2 centimètres cubes du deuxième vaccin (culture non chauffée) et plus tard à une inoculation intramusculaire de jus virulent. Injecté sous la peau du cobaye, le premier vaccin le tue presque toujours à dose d'un centimètre cube ; la culture non chauffée le tue constamment à la dose de 3 ou 4 gouttes. Cette culture tue le bœuf sous la peau à la dose de 2 centimètres cubes en région défendue.

Le premier procédé de Leclainche et Vallée sera avantageusement substitué au procédé Arloing. La méthode basée sur l'emploi des cultures n'est pas encore entrée dans la pratique, mais elle deviendra certainement la méthode de choix. Notons en terminant que, d'après MM. Leclainche et Vallée, les divers vaccins du charbon symptômatique ne représentent pas en réalité des virus affaiblis.

On peut atténuer ou affaiblir les microbes en faisant agir sur eux différentes causes nuisibles. Nous citerons, comme exemples, les vaccins charbonneux obtenus par l'action du chauffage (Toussaint-Chauveau); de la lumière (Arloing) de l'O. comprimé (Chauveau), des antiseptiques (Roux et Chamberland). Aucun de ces vaccins n'est entré dans la pratique ; aussi n'avons-nous point à insister.

3° CONSERVATION DE LA VIRULENCE

Nous avons indiqué précédemment les précautions qu'il était nécessaire de prendre pour conserver aux micro-organismes leur vitalité. La virulence est encore plus difficile à maintenir, lorsqu'on ne peut pas faire de fréquents passages. On évitera la chaleur, l'air, la lumière, l'acidité et la trop grande alcali-

nité des milieux ; on donnera la préférence aux milieux solides et aux milieux sérum ; enfin on s'adressera autant que possible, pour la conservation, à des cultures riches. Les spores gardent infiniment mieux la virulence que les organismes filamenteux. On peut même les conserver à l'état sec (poudre Arloing, spores charbonneuses fixées à la surface des fils de soie). Il est cependant indiqué de les soustraire à la chaleur et à la lumière.

Les humeurs et pulpes d'organes seront aspirées dans des pipettes que l'on scellera ensuite. Les fragments de viscères seront plongés dans la glycérine neutre (30° Baumé), suivant la méthode indiquée par M. Roux pour le virus rabique. La glycérine convient également à certaines lymphes (vaccin, claveau). L'eau salée (10 pour 100) constitue un moyen plus infidèle ; on n'y peut d'ailleurs mettre que des morceaux d'organes sans impuretés. Tous les produits précédents devront être maintenus à la glacière. Selon les cas, la virulence se conserve plus ou moins longtemps. Mais en principe, répétons-le, il ne faut compter que sur des passages suffisamment répétés.

SECONDE PARTIE

ÉTUDE PRATIQUE DES LEUCOCYTES, DE L'IMMUNITÉ, ETC.

CHAPITRE I

MORPHOLOGIE ET NUMÉRATION DES LEUCOCYTES

Le plus grand nombre des leucocytes appartient au groupe des *éléments phagocytaires*. On désigne sous ce nom certaines cellules, mobiles ou fixes, qui jouissent du pouvoir de saisir activement, d'englober et de digérer (lorsqu'elles sont assimilables) les fines particules inorganiques, organiques et organisées (cellules mortes et même vivantes). Ce pouvoir est en rapport avec l'absence totale ou partielle de paroi limitante, la mobilité totale ou partielle et la sécrétion de sucs digestifs intraprotoplasmiques.

Le *système phagocytaire* de l'homme et des animaux supérieurs est donc représenté par *deux groupes d'agents*, les uns *mobiles* et les autres *fixes*. Les éléments fixes comprennent certaines cellules ectodermiques (c'est ainsi que les éléments nerveux sont capables d'englober le bacille de la lèpre) et diverses cellules mésodermiques (endothéliums vasculaires et lymphatiques, cellules de Kupffer (du foie) en particulier).

Les éléments mobiles comprennent, outre les cellules géantes normales de la moelle osseuse et les

cellules géantes pathologiques, les leucocytes de la lymphe et ceux du sang. Ce sont ces derniers que nous aurons particulièrement en vue. Nous rappellerons leurs variétés, puis nous indiquerons les méthodes destinées à colorer les diverses granulations qu'ils peuvent contenir. Nous étudierons ensuite la numération des leucocytes et nous dirons un mot du cytodiagnostic, qui peut rendre des services en bactériologie.

1° VARIÉTÉS DES LEUCOCYTES

On en distingue quatre principales :

1° **Les lymphocytes.** — Ce sont les seuls leucocytes qui ne soient pas phagocytes. Ils représentent de petites cellules, dont le diamètre n'atteint pas toujours celui des hématies, cellules constituées presque exclusivement par un noyau rond très chromatique. Le protoplasma, à peine développé, prend médiocrement les matières tinctoriales (basiques). Chez l'homme adulte, on compte environ 3 lymphocytes sur 100 globules blancs.

2° **Les mononucléaires.** — Éléments volumineux, à noyau excentrique, arrondi ou incurvé, vésiculeux, peu chromatique, à protoplasma abondant et assez fortement colorable (35 pour 100 environ).

3° **Les polynucléaires**, reconnaissables à leur noyau multilobé, très chromatique et à leur plasma incolore (après teinture par les composés basiques). Ils représentent des cellules adaptées spécialement à la diapédèse (60 pour 100 environ).

4° **Les éosinophiles**, comprenant deux masses nucléaires arrondies, séparées ou réunies, mal colorables, et des granulations oxyphiles qui remplissent le corps cellulaire (2 pour 100 environ).

On compte environ 8 000 leucocytes par millimètre cube de sang chez l'homme adulte, soit un

globule blanc pour environ 625 hématies. Les mononucléaires sont plus abondants chez l'enfant, les polynucléaires chez le vieillard.

2° GRANULATIONS DES LEUCOCYTES

M. Ehrlich a montré que les globules blancs contiennent diverses granulations, facilement décelables grâce à leurs réactions vis-à-vis des dérivés d'aniline. Nous allons étudier les différentes façons de les mettre en évidence. Notons que certaines méthodes indiquées plus bas (celles, par exemple, qui emploient l'orange, la fuchsine acide et le vert de méthyle) colorent à la fois plusieurs sortes de granulations.

1° **Granulations** α, *éosinophiles ou oxyphiles*. — Elles se colorent par les composés acides. On ignore leur origine exacte, mais on sait que dans l'intérieur des polynucléaires, les bactéries (et plusieurs produits organisés) se transforment souvent en grains éosinophiles. Nous étudierons successivement la coloration des granulations éosinophiles sur lames et dans les coupes.

1° **Coloration sur lames.** — On peut employer :

1° La *méthode éosine-bleu de méthylène* ou éosine-thionine, décrite dans la première partie de cet ouvrage.

2° Le *mélange suivant, dû à M. Ehrlich,* et que beaucoup d'auteurs nomment improprement mélange triacide :

Orange ; sol. aqueuse saturée..	120	cent. cubes.
Fuchsine acide ; sol. aqueuse saturée.. . .	80	—
Vert de méthyle ; sol. aqueuse saturee. . .	100	—
Eau distillée.	300	—
Alcool absolu.	180	—
Glycérine.	50	—

(Ce mélange ne doit pas être filtré ; les deux suivants non plus.)

3° Le *liquide Ehrlich-Biondi-Heidenhain.* Il con-

tient les mêmes éléments que le précédent. On le prépare comme il suit : prendre 100 centimètres cubes de solution saturée d'orange dans l'eau ; ajouter, en agitant constamment, 20 centimètres cubes de solution aqueuse saturée de fuchsine acide et 50 centimètres cubes de solution aqueuse saturée de vert de méthyle. Allonger de 60 à 100 volumes d'eau. Quand la solution vieillit, son acidité diminue, par l'attaque du verre qui la contient. Il faut ajouter alors un peu d'acide acétique en tâtonnant.

Nous devons faire remarquer que la préparation des deux liquides précédents est très délicate. Il est indispensable, notamment, d'employer des couleurs bien définies, telles que : orange G, rubine S et vert de méthyle 00 de l'Aktiengesellschaft de Berlin. Aussi conseillons-nous d'acheter, chez Grübler par exemple, les liquides tout préparés.

4° Le *liquide acidophile d'Ehrlich* (appelé, lui aussi, triacide, par quelques auteurs ; ici la dénomination est parfaitement justifiée), dont voici la formule :

Aurantia.	} *āā* 2 grammes.
Eosine..	
Induline.	
Glycérine..	30 —

Ce liquide est également d'une préparation difficile et il y a avantage à se le procurer tout fait.

Le temps pendant lequel doivent agir sur les préparations les différentes solutions que nous venons de mentionner varie considérablement, pour une même formule, d'un réactif à l'autre. Toutefois, il faut toujours moins longtemps pour les préparations sur lames que pour les coupes. La coloration terminée, on lave, on sèche et on monte.

2° **Coloration dans les coupes.** — On fait agir l'un des trois derniers réactifs que nous venons de citer.

On colore plus ou moins longtemps, selon l'épaisseur des coupes, le réactif fixateur et les propriétés de la solution qu'on a entre les mains. Celles-ci varient beaucoup suivant le mode de préparation et l'âge du mélange colorant. Aucune règle générale ne saurait donc être formulée, ici encore. Une fois la coloration obtenue, on lave à l'eau, on déshydrate rapidement et on monte au baume.

3° **Résultats obtenus.** — La méthode 1 colore les granulations éosinophiles et l'hémoglobine en rouge et les noyaux en bleu ou violet. Le protoplasma est teinté en bleu ou violet, ou demeure incolore.

Avec les méthodes 2 et 3, les granulations éosinophiles sont colorées en rouge brun et l'hémoglobine en orange. Les noyaux sont teints en bleu et en vert bleu. Le protoplasma reste grisâtre.

La méthode 4 colore les granulations éosinophiles en rouge, l'hémoglobine en orange, les noyaux en bleu noir, le protoplasma en gris.

2° **Granulations** β, *pseudo-éosinophiles ou indulinophiles.* — Ces granulations font défaut chez l'homme et chez le singe. Elles se rencontrent au sein des polynucléaires du cobaye et du lapin, soit dans le sang, soit dans les exsudats. Elles manifestent plus d'affinité pour les dérivés acides peu diffusibles (induline) que pour les autres (éosine). Les quatre méthodes que nous venons d'indiquer sont applicables ici, mais elles colorent simultanément les granulations α et β. Si on voulait colorer ces dernières seules, on emploierait l'hématoxyline et la fuchsine acide en solution acétique (Ehrlich).

3° **Granulations** γ *ou basophiles.* — Les granulations basophiles sont contenues dans certaines cellules du tissu conjonctif (Mastzellen de M. Ehrlich) et dans la lymphe des rats. L'un de nous les a rencontrées également dans le sang des bovidés normaux, où elles

sont d'ailleurs peu abondantes. Les éléments à granulations basophiles montrent un noyau clair, très peu chromatique et donnant l'impression d'un trou lorsque les grains ambiants sont fortement colorés.

Dans les préparations sur *lames*, les granulations basophiles seront mises en évidence à l'aide d'une couleur basique quelconque, convenablement acidifiée à l'acide acétique ; on colore plus ou moins longtemps selon les cas (6 heures en moyenne) et on traite par l'alcool. Les granulations γ restent seulent teintées. On peut employer également le bleu polychromatique de Unna, qui colore les granulations γ en rouge rubis, comme nous l'avons déjà dit.

Les *coupes* seront plongées 12 à 24 heures dans le mélange suivant (Ehrlich) :

Eau.	100	cent. cubes.
Sol. saturée de dahlia dans l'alcool absolu.	50	—
Acide acétique glacial.	10-12	—

On décolore à l'alcool, lave au xylol et monte dans le baume.

Mieux vaut encore faire une double coloration, en employant la formule suivante, due à M. Westphal :

Carmin de Partsch-Grenacher.	100	cent. cubes.
Glycérine.	100	—
Sol. saturée de dahlia dans l'alcool absolu..	100	—
Acide acétique glacial.	20	—

Le carmin de Partsch-Grenacher se prépare en dissolvant 2 grammes de carmin pur dans 200 centimètres cubes d'eau distillée, alunée à 2,5 pour 100. On chauffe 1/4 d'heure ; on filtre et on ajoute 1 pour 100 de phénol.

4° **Granulations** ε *ou neutrophiles*. — Les granulations neutrophiles sont constitués par une fine poussière, que teintent électivement les mélanges de composés acides et basiques (dits couleurs neutres).

On les rencontre dans les polynucléaires de l'homme, du singe, du cheval où ils remplacent les pseudo-éosinophiles qu'on voit chez le lapin et chez le cobaye. On peut avoir à les colorer soit dans le sang, soit dans les exsudats. Un certain nombre de procédés ont été employés à cet effet.

1° *M. Spilling* conseille le *mélange suivant*:

Fuchsine acide saturée dans l'eau.	5	volumes.
Bleu de méthylène concentré dans l'eau. . .	1	—
Eau distillée.	5	—

On ajoute peu à peu le bleu à la fuchsine acide, en agitant, on étend avec l'eau, on laisse reposer pendant quelques jours et on filtre.

Les préparations fixées seront colorées pendant 5 à 10 minutes, lavées à l'eau et séchées. Les hématies apparaissent teintées en rouge, les granulations en violet.

2° Le *mélange suivant* a encore été *employé par M. Spilling* :

Fuchsine acide saturée dans l'eau. . . .	150	cent. cubes.
Vert de méthyle concentré dans l'eau. .	25	—
Alcool absolu.	50	—
Eau distillée.	500	—

3° Enfin *M. Ehrlich préconise* un *liquide comparable au « Biondi »* et au soi-disant « triacide ». On mélange 125 centimètres cubes de solution aqueuse saturée d'orange avec 125 centimètres cubes d'une solution concentrée de fuchsine acide (dans de l'eau, additionnée de 20 pour 100 d'alcool). On ajoute 75 centimètres cubes d'alcool absolu et 125 centimètres cubes de solution aqueuse saturée de vert de méthyle. On laisse mûrir longtemps, puis, sans filtrer, on colore. L'hémoglobine prend une teinte orange. Les noyaux sont verdâtres, les granulations éosinophiles grises, les granulations neutrophiles violet foncé.

3° NUMÉRATION DES LEUCOCYTES

A) La *numération des globules blancs* du sang offre une très grande importance en médecine clinique et expérimentale. Elle *peut être pratiquée avec divers appareils*. Un des meilleurs est celui de Thoma-Zeiss (fig. 116). Il comprend :

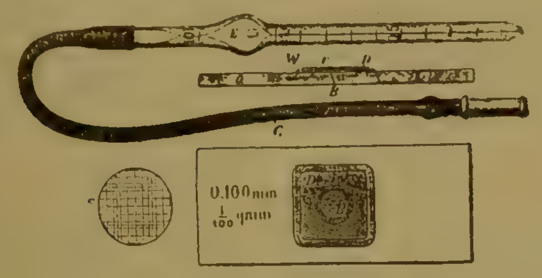


Fig. 116. — Compte globules de Thomas-Zeiss.

1° Une *pipette graduée*, ou *mélangeur*, consistant en un tube capillaire à paroi épaisse, étiré en pointe à une extrémité et muni d'une division appropriée. A l'autre extrémité est soufflée une ampoule, dans laquelle se trouve une perle de verre qui joue le rôle d'agitateur. Au-dessus de l'ampoule, le tube capillaire reprend d'abord ses proportions initiales, puis il se termine librement, en même temps que sa paroi s'amincit peu à peu. On peut adapter à l'extrémité libre un tube de caoutchouc, muni d'une embouchure d'ivoire.

2° Une *chambre à compter*. C'est un fort porte-objet, sur lequel est fixée au baume une mince plaque de verre, de forme carrée, percée au milieu d'une ouverture circulaire. Le centre de cette ouverture est occupé par un petit disque en verre, également cimenté au porte-objet et d'un diamètre un peu plus petit que celui de l'ouverture de la plaque. Il reste ainsi, entre les deux, un espace annulaire en forme de

rigole. La face supérieure du disque, qui constitue le fond de la chambre à compter, se trouve exactement à 1/10 de millimètre au-dessous du niveau de la surface supérieure de la plaque et porte un réticule tracé au diamant. Chaque champ de ce réseau offre 1/20 de millimètre de côté, soit une surface de 1/400 de millimètre carré. Un couvre-objet, à faces rigoureusement planes, s'applique sur la chambre à compter, dont sa face inférieure formera par conséquent le plafond.

B) *Lorsqu'on désire compter les globules blancs,* on plonge dans une goutte de sang, la pointe du mélangeur et on aspire jusqu'au trait marqué 1 ; puis on aspire une solution d'acide acétique à 1/300 jusqu'au trait marqué 11 (l'acide acétique a pour effet de dissoudre les hématies, dont la présence rendrait impossible la numération des globules blancs). On agite la perle de verre, pour bien mélanger. On rejette la partie du liquide qui remplit le tube capillaire au-dessous de l'ampoule et on dépose ensuite une goutte sur le milieu de la chambre à compter. On place le couvre-objet en évitant les bulles d'air et on examine au microscope. On parcourt successivement les 400 carrés du réseau, en faisant varier la vis micrométrique pour ne pas négliger les leucocytes situés au-dessus ou au-dessous du plan où se voient nettement les lignes qui limitent les carrés. Les globules, à cheval sur les bords du réseau, sont comptés chacun pour 1/2 globule. Le nombre obtenu en comptant les 400 carrés, multiplié par 100, donnera la quantité de globules blancs par millimètre cube de sang. Si, par exemple, on a trouvé 80 leucocytes dans les 400 carrés, c'est que le sang en contient 8 000 par millimètre cube, c'est-à-dire la proportion normale (pour l'homme).

Les mélangeurs seront toujours rincés après l'usage à l'aide de la solution suivante :

Eau distillée.	40	grammes.
Chlorure de sodium. . .	0,6	—
Alcool absolu.	60	—
Éther.	80	—

A défaut de l'appareil Thoma-Zeiss, on se servira du compte-globules Hayem-Nachet, très analogue. Il faut avoir soin, dans l'un et l'autre cas, de commander au fabricant un *mélangeur spécial pour la numération des leucocytes*, et non le mélangeur qui sert à celle des hématies. Ce dernier donnerait des dilutions bien trop étendues.

Pour compter les globules blancs d'un *exsudat*, on le dilue plus ou moins (selon sa richesse) avec de l'eau physiologique et on procède à la numération, comme précédemment (la solution acétique, inutile ici, sera remplacée par de l'eau salée).

C) *L'analyse qualitative* des leucocytes est des plus faciles à faire. On étale le sang ou l'exsudat sur lames et on colore par des procédés variés, selon la nature des granulations contenues dans les globules qu'on étudie. Le plus souvent on se contente d'une préparation à l'éosine-bleu de méthylène ou à l'éosine-thionine. On compte 100 leucocytes et on note parmi ces 100 combien il y a de mononucléaires, de polynucléaires et d'éosinophiles. Un calcul très simple permet ensuite de savoir combien il existe de leucocytes de chaque sorte pour 1 millimètre cube.

D) Dans les maladies infectieuses, les *modifications du nombre absolu des leucocytes ou de la quantité relative de leurs diverses variétés* constituent des signes diagnostiques et surtout pronostiques de valeur. Malheureusement cette valeur se trouve un peu diminuée par les contradictions des auteurs. Voici quelques exemples, résumés.

M. Stienon divise l'évolution de la *fièvre typhoïde* en trois stades : augmentation des polynucléaires,

diminution, retour à la normale. M. Besredka fait également de la polynucléose la caractéristique de la *diphtérie* humaine ou expérimentale ; l'absence de polynucléose comporterait pour lui un pronostic fatal.

Dans la *pneumonie*, la leucocytose, caractérisée surtout par l'augmentation du nombre des polynucléaires, se manifeste brusquement avec le frisson, subit ensuite des oscillations légères, et se relève aux approches de la crise. L'ascension progressive des polynucléaires comporte un pronostic fatal. Enfin on constate un parallélisme absolu entre la crise leucocytaire (retour à la normale), la crise thermique, la crise urinaire et la réapparition des chlorures dans l'urine (Löper). D'après MM. Chantemesse et Rey, l'augmentation totale des leucocytes et l'augmentation relative des polynucléaires indiquent, dans l'*érysipèle*, un dénouement mortel ; inversement, la diminution totale des leucocytes et la diminution relative des polynucléaires précèdent toujours la crise thermique ; l'imminence d'une rechute est marquée par la persistance ou le retour de la leucocytose et de la polynucléose. Mentionnons encore la polynucléose révélatrice des *suppurations profondes*.

MM. Courmont et Montagard ont signalé au contraire la mononucléose, comme la réaction type de la *variole*, même au début de la suppuration ; la polynucléose n'apparaît que lorsque les pustules sont complètement suppurées. Les mononucléaires, augmentés de nombre, offrent de grandes variétés d'aspect. M. Roger a retrouvé la même formule leucocytaire dans la *vaccine*. Pour M. Billet, l'*accès paludique* est annoncé par une hyperleucocytose qui atteint son apogée lors du stade algide ; puis survient l'hypoleucocytose qui offre son maximum à la fin de l'attaque. Le même auteur considère la lymphocytose comme caractéristique de la *malaria*.

4° CYTODIAGNOSTIC.

L'examen des différentes variétés de leucocytes, contenus dans les épanchements des séreuses, est susceptible de fournir des indications intéressantes au point de vue étiologique. C'est cet examen que M. Widal appelle le *cytodiagnostic*. Nous croyons devoir consacrer quelques lignes à ce sujet intéressant.

On recueille, par ponction exploratrice, quelques centimètres cubes d'épanchement, que l'on défibrine ; puis on centrifuge et on colore le dépôt étalé sur lame.

La *pleurésie* dite *à frigore* (pleurésie de nature tuberculeuse, comme l'ont démontré MM. Landouzy, Kelsch et Vaillard... etc), est caractérisée par la présence exclusive des lymphocytes, toujours mêlés à quelques globules rouges. Dans la *pleurésie secondaire des tuberculeux*, au contraire, le liquide montre peu d'hématies et de lymphocytes, mais par contre des polynucléaires déformés, malades, à noyau fragmenté et à granulations neutrophiles altérées. Les *pleurésies mécaniques* des cardiaques, des brightiques, des cancéreux, se reconnaîtront à la présence de grandes cellules endothéliales, isolées ou soudées par groupes. Dans les *épanchements pneumococciques* on trouve des globules rouges et quelques lymphocytes, mais surtout de nombreux polynucléaires et une quantité variable de cellules mononucléées, pour la plupart d'origine endothéliale, et dont quelques-unes ont englobé des polynucléaires. Etc.

Tout comme l'épanchement pleurétique, le *liquide de la méningite et de l'hydrocèle tuberculeuses* (Widal et Ravaut, Tuffier et Milian) est remarquable par la prédominance des lymphocytes. Dans les cas de *méningite cérébro-spinale*, ce sont les polynucléaires qui prédominent.

CHAPITRE II

MOBILITÉ, SENSIBILITÉS, MIGRATIONS DES LEUCOCYTES

I. *Étude de la mobilité.*

On sait, qu'à l'exception des lymphocytes, les globules blancs sont tous doués de mouvements analogues à ceux des amibes. Ces mouvements se révèlent par l'émission de pseudopodes aboutissant, selon les cas, soit à l'englobement de divers corpuscules, soit à la progression du leucocyte. Ils sont faciles à étudier lorsqu'on s'adresse à la lymphe du sac dorsal de la grenouille. M. Renaut conseille la technique suivante. On prend une grenouille de grande taille, qui ne soit pas sortie de l'eau depuis quelques heures (afin d'éviter qu'elle n'ait perdu trop d'eau par dessiccation). On l'immobilise dans un linge et on essuie la peau du dos. On collecte toute la lymphe en un point, par refoulement ; on traverse les téguments avec l'effilure d'une pipette ; on aspire et on dispose le liquide en chambre humide de Ranvier. Cette précaution est indispensable à la longue conservation de la vitalité des globules. A l'examen microscopique, on voit ceux-ciexécuter leurs mouvements et, peu à peu, se diriger vers l'air contenu dans la rigole de la cellule. Si l'on voulait étudier la lymphe des animaux à sang chaud, on la prélèverait dans le canal thoracique ou, plus simplement, dans les séreuses ; l'emploi de la platine chauffante serait natu-

rellement indispensable et on réglerait celle-ci vers 37°. Quant aux mouvements des leucocytes humains, ils peuvent être aisément constatés dans le sang et surtout le sang leucémique.

II. Étude des sensibilités.

Les deux formes les plus intéressantes sont la sensibilité tactile et la sensibilité chimique.

a) **Sensibilité tactile.** — Les leucocytes réagissent en prenant contact avec les corps par la plus grande surface possible. Pour s'en assurer, on peut introduire un petit fragment de moelle de sureau dans le sac lymphatique dorsal de la grenouille. Après un séjour de 24 heures, les leucocytes ont pénétré en très grand nombre dans le tissu végétal et se voient accolés aux membranes cellulaires. On peut aussi prélever, soit dans le sac lymphatique dorsal, soit dans la cavité péritonéale de la grenouille, une goutte de lymphe qu'on dépose sur une lamelle. Cette lamelle est retournée et placée sur un cadre de carton imbibé d'eau, de façon à soustraire complètement le liquide à l'évaporation. Au bout de quelque temps, on constate que, contre la lamelle, les globules se sont complètement aplatis ; ils sont moins étalés au niveau de la surface libre de la goutte, parce que la tension superficielle demeure toujours inférieure à la résistance du couvre-objet ; enfin ils restent sphériques au sein du liquide. Quand on diminue la tension superficielle de la goutte, en plaçant un cheveu à la surface, beaucoup de leucocytes redeviennent arrondis au voisinage du poil (Massart et Bordet).

b) **Sensibilité chimique.** — Certaines substances ont le pouvoir d'attirer les leucocytes (chimiotaxie positive), d'autres les repoussent (chimiotaxie néga-

tive), d'autres enfin demeurent sans effet (chimiotaxie indifférente).

Pour étudier la chimiotaxie leucocytaire, M. Gabritchewsky se sert de tubes capillaires longs de 15 à 20 millimètres et larges de $0^{mm},3$. Ils sont remplis du liquide à étudier, puis fermés à une extrémité et introduits, soit sous la peau du dos d'une grenouille, soit sous la peau de l'oreille d'un lapin (après qu'on a, dans ce dernier cas, préparé un « trajet » au moyen d'une aiguille stérile). Les tubes sont retirés au bout de 24 heures au plus et examinés au microscope; un faible grossissement permet de voir le bouchon leucocytaire plus ou moins épais qui obstrue leur extrémité ouverte. Si l'on désire compter ou étudier les leucocytes ainsi attirés, on brise le bout fermé du tube ; on l'approche d'une petite flamme et on applique en même temps l'autre bout près d'une lamelle ; le liquide est chassé sur celle-ci. Il va de soi que, lorsque la chimiotaxie est positive, on trouve beaucoup de leucocytes dans les tubes et qu'on en rencontre très peu lorsqu'elle est négative. Enfin, les leucocytes existent en nombre modéré quand la chimiotaxie reste indifférente. Parmi les substances qui, introduites dans les tubes capillaires, donnent lieu à des phénomènes chimiotactiques positifs, nous citerons comme exemple les cultures charbonneuses, vivantes ou mortes. Parmi celles qui engendrent une chimiotaxie négative, il faut mentionner les sels de Na et de K concentrés (10 pour 100) ; l'acide lactique, depuis 0,1 pour 100 ; la quinine, à 0,5 pour 100 ; l'eau chloroformée ; la glycérine, depuis 1 pour 100. Enfin, avec les sels de Na et de K en solution faible (0,1 à 1 pour 100), l'eau distillée, le sang, l'humeur aqueuse, la peptone à 1 pour 100, la chimiotaxie reste indifférente.

Notons encore que la méthode de M. Gabrit-

chewsky permet de constater des phénomènes de phagocytose quand on a introduit dans les tubes des cultures vivantes ou mortes.

MM. Massart et Bordet déposent, dans le péritoine des lapins, des faisceaux de tubes capillaires et les retirent après 8 heures. Ils démontrent la réalité de la chimiotaxie négative à l'aide d'une expérience très probante. Le péritoine d'un lapin reçoit des faisceaux de tubes contenant, les uns une culture de b. pyocyanique, d'autres cette même culture additionnée de 1 pour 1000 d'acide lactique, d'autres enfin la culture additionnée de 1 pour 500 d'acide lactique. Après 8 heures, les deux premières catégories de tubes renferment de nombreux leucocytes ; la troisième n'en renferme pas. Une autre expérience des mêmes auteurs prouve, de façon saisissante, l'action empêchante de la narcose. On donne du chloral à un lapin, et, une demi-heure plus tard, on lui dépose dans le péritoine des tubes remplis de substances très attirantes (par exemple, la sérosité musculaire d'un lapin mort de charbon symptomatique). On continue à donner du chloral pendent 3 heures et demie et jusqu'à concurrence de 2 grammes. Dans ces conditions, les tubes capillaires demeurent absolument vides. La méthode des tubes capillaires permet encore de démontrer que les microbes peu virulents attirent plus que les microbes virulents ; on s'adressera, par exemple, aux vaccins charbonneux et au virus correspondant. Elle permet également de s'assurer que les cultures qui attirent très peu à l'état normal attirent énergiquement au contraire lorsqu'on vient à les diluer (MM. Massart et Bordet comparent, à cet effet, une culture de hog choléra normale et la même culture diluée de moitié à l'aide de la solution physiologique). Elle révèle enfin que, chez les animaux vaccinés ou réfractaires, la répulsion est remplacée par une attraction.

Faisons remarquer en terminant, que lorsqu'on veut savoir si une substance attire les leucocytes, il est bon de mettre dans le péritoine, à côté des tubes remplis de cette substance, d'autres tubes remplis d'une substance certainement attirante, de l'eau peptonisée glucosée par exemple (M. et B.)

III. *Étude des migrations des leucocytes.*

Elle comprend l'étude de l'hyperleucocytose et de l'hypoleucocytose générales et locales, et l'étude de la diapédèse.

A. Hyperleucocytose et hypoleucocytose générales.

Il suffit, pour provoquer l'*hyperleucocytose*, d'injecter à un animal de faibles doses de cultures ou de toxines ; au stade initial d'hypoleucocytose fait suite un stade d'hyperleucocytose. Chez le chien, M. Hahn a réussi à provoquer l'hyperleucocytose, en injectant 7 grammes de nucléine Parker ; cinq heures plus tard, elle était à son maximum. Il a réussi de même chez l'homme, à l'aide d'injections de tuberculine ; l'hyperleucocytose offrait alors son acmé après 24 heures.

On détermine l'*hypoleucocytose* en injectant à un animal de fortes doses de toxines ou de microbes. Quand on ne veut pas influencer gravement l'organisme, on a recours aux poudres inertes. Ainsi, M. Bordet inocule lentement, dans la jugulaire d'un cobaye, 1/10 de centimètre cube de l'émulsion suivante :

Carmin..	50 centigrammes.
Eau physiologique. . .	10 cent. cubes.

Au bout de deux heures, le nombre des leucocytes est tombé de 11 000 à 3 000.

B. Diapédèse.

Un procédé simple et classique consiste à étaler le mésentère d'une grenouille sur une plaque de liège perforée et disposée sous le microscope. L'excitation produite par l'air amène bientôt l'apparition du phénomène, qu'il est très facile d'observer.

On peut aussi se servir des têtards de grenouille. On les plonge dans une solution de curare à 1 pour 100 et on observe au microscope les capillaires de leurs nageoires; ces vaisseaux montrent très nettement la diapédèse, qu'a provoquée le curare. Il faut avoir soin de maintenir les têtards humides sur le porte-objet, en les arrosant fréquemment avec l'eau curarisée.

Dans les recherches bactériologiques, on reconnaît la diapédèse à ses effets, c'est-à-dire à l'afflux leucocytaire *loco læso*. La narcose empêche la diapédèse, et conséquemment l'afflux leucocytaire. En injectant sous la peau 1 centimètre cube de teinture d'opium (Codex français), par 320 grammes de cobaye, M. Cantacuzène entrave la diapédèse pendant 5 heures environ. Un agent excitant introduit, par exemple, dans le péritoine ne provoque alors aucune réaction.

C. Hyperleucocytose et hypoleucocytose locales.

1° HYPERLEUCOCYTOSE LOCALE

Deux cas sont à considérer, suivant que c'est une poly ou une mononucléose qu'on désire provoquer.

Polynucléose. — On s'adresse d'habitude aux séreuses (péritoine ou plèvre), dans lesquelles on injecte des substances variées, telles que bouillon, solution physiologique, caséine, cultures de staphylocoque

tuées par la chaleur (2 heures à 70°). On peut se proposer deux buts différents : ou bien renforcer la résistance locale du péritoine (du cobaye ou du lapin); c'est une expérience courante, à l'Institut Pasteur, dans les recherches sur la phagocytose — ou bien obtenir un exsudat pleural richeen leucocytes (chez le lapin), ainsi que cela se pratique dans les laboratoires belges et allemands, pour étudier l'action bactéricide des leucocytes et des extraits leucocytaires. Indiquons séparément ces deux sortes d'expériences.

1° Péritoine du cobaye ou du lapin. — On injecte habituellement de l'eau physiologique (Pierallini) ou du bouillon frais (Garnier). La quantité le plus souvent inoculée est de 3 centimètres cubes chez le cobaye et de 6 centimètres cubes chez le lapin. Cependant on peut dépasser de beaucoup ces chiffres et aller, même chez le cobaye, jusqu'à 20 centimètres cubes. L'injection est tout à fait inoffensive. La température du liquide doit être de 38° à 39°. Il survient d'abord de l'hypoleucocytose, puis une hyperleucocytose locale s'établit peu à peu, qui offre son maximum vers la 20e heure. Le troisième jour, tout est revenu à la normale. Si, sur un cobaye « préparé » par une première inoculation d'eau salée ou de bouillon, on répète l'injection le lendemain, c'est-à-dire au moment où la leucocytose bat son plein, on ne constate plus d'hypoleucocytose initiale. Les cellules sont déjà habituées à la substance employée. Elles sont même « renforcées » d'une façon générale.

2° Plèvre du lapin. — Nous indiquerons, d'après M. Colard, le moyen de préparer une solution de caséine très active. Injectée dans la plèvre du lapin, elle fournit, le surlendemain, une quantité égale d'exsudat pyoïde. On malaxe, sous un filet d'eau, de la farine de froment renfermée dans un petit sac de toile, jusqu'à ce que l'eau s'écoule incolore. A ce moment l'amidon

a disparu et il ne reste plus que le gluten. 1 kilogramme de farine donne environ 150 grammes de gluten humide. 100 grammes de ce gluten sont mis à macérer dans quatre litres d'eau, additionnée de quatre grammes de potasse par litre. On agite de temps en temps, pour favoriser la dissolution. Après quelques jours on décante, puis on passe à la toile et on ajoute un très léger excès d'acide acétique : le gluten purifié se précipite (en hiver, on chauffe un peu pour activer la précipitation). On épuise le gluten par l'alcool à 60°, puis par l'alcool à 80° et enfin par l'alcool absolu, afin de dissoudre la fibrine végétale. On sèche doucement le résidu, qui représente la caséine végétale suffisamment pure et on le conserve dans un flacon dessiccateur. Un kilogramme de farine donne environ 20 grammes de caséine pure et sèche. Lorsqu'on désire se servir de ce produit, on le fait digérer à 37° dans une solution de potasse à 0,5 pour 100. On précipite par l'acide chlorhydrique dilué et on redissout dans l'eau additionnée de quelques gouttes de soude caustique. On injecte dans la plèvre du lapin 8 à 10 centimètres cubes d'une solution à 5-10 pour 100.

Mononucléose. — La mononucléose s'obtient très facilement chez le cobaye traité par la pilocarpine. M. Besredka injecte 1/8 de milligramme et observe la mononucléose maxima après 48 heures ; M. Funck injecte un milligramme et provoque la mononucléose en 24 heures. On peut aussi pratiquer au cobaye une laparotomie aseptique ou le traiter par le sérum antileucocytaire (*ubi infra*).

2° HYPOLEUCOCYTOSE LOCALE

Un bon sujet d'étude pour l'hypoleucocytose locale est constitué par la germination *in vivo* des « spores

pures » des anaérobies pathogènes. Des cultures de bacille tétanique (Vaillard), de vibrion septique (Besson) ou de bactérium Chauvœi (Leclainche) sont chauffées 3 heures à 80°, pour détruire la toxine et inoculées sous la peau du cobaye. On constate leur parfaite innocuité, liée à une phagocytose rapide et totale. Parallèlement, on injecte les mêmes spores mêlées, soit à des microbes « favorisants » (b. prodigiosus, par exemple, dans le cas de tétanos), soit à des toxines diverses, soit à des substances chimiques variées, telles que l'acide lactique à 1/5, l'acide acétique à 1/5, la solution saturée de KCl, l'alcool étendu, etc. (Roux et Nocard). On observe alors que ces divers moyens écartent les leucocytes et permettent aux spores pures de germer et de produire ainsi l'infection.

CHAPITRE III

SUBSTANCES BACTÉRICIDES ET AGGLUTINANTES DES SÉRUMS NORMAUX. — PHAGOCYTOSE

I. *Substances bactéricides.*

M. Nuttall a démontré le premier que le sang défibriné de certains vertébrés est microbicide vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse et que cette action antiseptique disparaît par chauffage à 55°. M. Buchner, à la suite de nombreux travaux sur le pouvoir bactéricide des sérums vis-à-vis de divers organismes, admit tout d'abord que ce pouvoir, dû à des substances qu'il nomma *alexines,* appartient au plasma lui-même. M. Denys ayant établi que les leucocytes constituaient la source unique des alexines, M. Buchner se rallia à cette manière de voir, mais soutint que les principes microbicides sont excrétés par les globules blancs vivants. M. Metchnikoff a prouvé au contraire que, seule, la destruction des leucocytes permet l'issue des substances bactéricides. Ces substances, de nature inconnue (encore nommées *lysines* ou *cytases*), sont très voisines certainement des diastases. Nous étudierons tour à tour les alexines du sérum et celles des leucocytes.

1° LYSINES DU SÉRUM

A. **Préparation.** — Les sérums seront préparés d'après les procédés ordinaires.

B. **Action sur les bactéries.** — Elle peut être mise en évidence, soit par l'examen microscopique, soit par les cultures.

1° *Examen microscopique.* — On aura soin d'employer des microbes jeunes et des sérums frais. On se sert ordinairement de cultures sur gélose; on les mêle directement au sérum, ou bien on fait une émulsion préalable dans l'eau physiologique. Quand on a recours à une culture liquide, il faut savoir que la présence du milieu peut influer sur les résultats. Le mélange de sérum et de culture est mis en goutte pendante ou bien conservé dans des tubes où l'on fait des prélèvements de temps en temps. D'après les recherches de M. Fischer, l'action bactéricide s'exerce moins énergiquement dans le second cas.

Les lysines peuvent tuer les microbes sans les modifier extérieurement; c'est l'éventualité la plus fréquente. Mais, parfois, elles engendrent des altérations caractéristiques. Ainsi, on voit certains sérums produire des gonflements ou des déformations variées (transformation des vibrions en granules, par exemple). On peut observer aussi une évacuation du contenu microbien et même une dissolution totale. Parfois l'acte microbicide est précédé d'agglutination. Les alexines sont capables de s'attaquer aux spores elles-mêmes. Le sérum du lapin détruit celles du subtilis (Halban-Podbelsky).

Un bon sujet d'études est fourni par l'action du sérum de rat sur la bactéridie charbonneuse (Roux et Metchnikoff, Sawtchenko); on assiste, au microscope, à une dissolution progressive des corps microbiens. Au lieu de cultures virulentes, il vaut mieux employer le premier vaccin; le phénomène est encore plus rapide. Un autre exemple, très démonstratif, est constitué par l'action, sur le vibrion cholérique, des sérums de rat, de bœuf ou de porc (Fischer). Ici,

c'est la transformation en granules qu'on observe.

2° *Cultures.* — On mélange la culture et le sérum et on ensemence en plaques, au début de l'expérience et pendant les heures suivantes. Onprolonge plus ou moins le contact, selon les cas; mais il est toujours bon de contrôler après 24 heures et quelquefois davantage. On assiste, soit à une disparition progressive, soit (le plus souvent) à une diminution momentanée des germes, qui renseignent sur le pouvoir bactéricide du sérum étudié.

Si l'on a recours aux milieux liquides, nous ne saurions trop répéter que les substances nutritives qui se trouvent dans ces milieux peuvent exercer sur le pouvoir bactéricide une action empêchante. L'influence bactéricide sera aussi d'autant moins marquée que le nombre des microbes introduits est plus considérable. Les microbes fixent en effet les principes nocifs des sérums, comme ils fixent les antiseptiques, en vertu d'un véritable phénomène de teinture et appauvrissent ainsi le liquide. Enfin, la destruction des germes s'accomplit mieux si le sérum agit à la température de l'étuve. Il faut avoir soin de bien agiter le mélange avant les prises, à cause de l'influence agglutinante de certains sérums. L'agglutination pourrait faire croire à une disparition des germes, quand les prélèvements ont été faits en dehors des amas ou, tout au moins, à une diminution numérique des micro-organismes, quand chaque colonie développée sur plaque a pris naissance aux dépens d'un amas et non d'une unité microbienne (Halban). C'est afin d'éviter radicalement cette cause d'erreur qu'il est indiqué de prolonger l'expérience pendant un jour ou plus. Nous ferons remarquer en terminant que le sérum dilué dans l'eau distillée est moins actif que le sérum dilué dans l'eau physiologique (Schattenfroh, Lachtchenko) et que le pouvoir bactéricide des sérums est détruit

par un chauffage d'une demi-heure à 55°. Ce chauffage atteint les alexines proprement dites, ou cytases de M. Metchnikoff; il est sans influence sur les *philocytases* (voir chapitres suivants). Certains sérums normaux contiennent sans doute des philocytases, susceptibles d'agir sur les bactéries, de même que certains sérums normaux contiennent des philocytases, susceptibles d'agir sur les cellules animales (Ehrlich et Morgenroth). La question est encore mal connue.

Quoi qu'il en soit, nous conseillons les sujets d'étude suivants :

a) Action du sérum de rat sur la bactéridie charbonneuse. M. Sawtchenko a montré que, dans le mélange :

Émulsion de premier vaccin. . .	II	gouttes.
Sérum de rat..	X	—
Sérum (indifférent) de cobaye. .	X	—

les bactéridies se trouvaient dissoutes en 24 heures à 37°.

b) Action du sérum de lapin sur les spores du b. subtilis. M. Podbelsky a pu détruire en 1-2 jours, à 37°, 3000 spores dans 4 centimètres cubes de sérum.

c) Action du sérum de lapin sur les vibrions cholériques (Bail). 2 centimètres cubes de sérum de lapin peuvent détruire 3500 vibrions en 8 heures à 17°, en 4 heures à 37°.

Tous ces chiffres ne donnent naturellement que des *indications fort approximatives*. Même lorsqu'on compare le même microbe et la même espèce animale, l'effet varie selon la culture employée et le sujet qui a fourni le sérum. Inutile de dire que dans certains cas l'action bactéricide sera avantageusement étudiée en inoculant les mélanges de sérum et de bactéries. C'est ce qui a été souvent fait pour le ba-

cillus anthracis, soumis à l'influence du sérum de rat.

C. **Fixation des lysines sur les bactéries.** — Il est facile de démontrer la fixation des alexines sur les microbes, en centrifugeant le mélange après un certain temps. Suivant les circonstances, le liquide clair a perdu partiellement ou totalement son pouvoir bactéricide.

D. **Comparaison des sérums et des liquides d'œdème.** — On compare souvent le pouvoir bactéricide du sérum à celui d'un liquide d'œdème du même animal. Très pauvres en leucocytes, les liquides d'œdème sont infiniment moins bactéricides que le sérum. On peut provoquer un *œdème soit actif, soit passif.* M. Sawtchenko inocule la bactéridie charbonneuse virulente au rat et puise à la périphérie de l'œdème local. C'est là une méthode d'exception. Le plus souvent, on a recours à l'œdème de stase. On met un anneau de caoutchouc à la base de la patte d'un cobaye ou d'un rat, ou bien à la base de l'oreille d'un lapin ; on serre modérément, ni trop, ni trop peu ; après quelques heures, on enlève l'anneau ; on chasse le sang par un léger massage et on prélève le liquide avec une très fine pipette, pour ne pas léser les capillaires, ce qui enrichirait le transsudat en leucocytes et, partant, en alexines.

E. **Accoutumance des bactéries aux alexines.** — Les bactéries s'accoutument aux alexines. Cette accoutumance est facile à réaliser, en cultivant les microbes dans des mélanges où prédomine de plus en plus le sérum. Mais, une fois habitués au sérum pur, les microbes sont encore sensibles à des alexines plus fortes, à celle des exsudats du même animal par exemple (Trommsdorf). On n'obtient aucune accoutumance, bien entendu, par culture dans les sérums rendus inactifs, c'est-à-dire chauffés 1/2 heure à 55°.

2° LYSINES DES LEUCOCYTES

On peut étudier l'action des exsudats ou des extraits leucocytaires.

Exsudats. — A l'aide des procédés déjà indiqués, on produit un exsudat pleural ou péritonéal chez le lapin, péritonéal chez le cobaye. On donne, d'habitude, la préférence à l'exsudat pleural du lapin. Au bout de 24 heures, on tue l'animal par hémorragie, afin de ne pas rencontrer de sang dans l'exsudat, et on recueille celui-ci. Il peut être étudié tel quel, au point de vue de son action bactéricide ; on le compare souvent alors au sérum du même animal. En général, mais non toujours, les exsudats se révèlent plus actifs que le sérum. Ainsi, les épanchements du lapin sont supérieurs au sérum vis-à-vis du b. coli, du b. typhique, du staphylocoque ; ils sont, par contre, inférieurs vis-à-vis du vibrion cholérique. On peut aussi étudier comparativement le plasma de l'exsudat centrifugé et le liquide total. Ce dernier est ordinairement plus microbicide (exception faite pour le cas du vibrion cholérique). On peut enfin laver à l'eau physiologique le dépôt de l'exsudat centrifugé et émulsionner les leucocytes dans la solution saline. L'émulsion se montre bactéricide, même quand toute l'opération a été faite avec de l'eau distillée au lieu d'eau physiologique (Schattenfroh).

De bons types d'étude sont constitués par l'action sur le staphylocoque, des exsudats de cobaye ou de lapin (Schattenfroh) ; ou bien encore par l'action de l'exsudat de lapin sur le vibrion cholérique (Bordet).

M. Buchner a constaté qu'en faisant geler et dégeler successivement 2 à 3 fois un exsudat et en le laissant 2 ou 3 jours dans la glacière, on augmente beau

coup son pouvoir bactéricide. Cette expérience nous conduit à l'étude des extraits leucocytaires.

Extraits leucocytaires. — Un moyen très simple (perfectionnement du précédent) consiste à laver les leucocytes à l'eau physiologique, puis à les émulsionner dans la solution saline et à faire geler et dégeler 2 ou 3 fois l'émulsion. On laisse ensuite un ou deux jours dans la glacière : les alexines sont abondamment mises en liberté (Schattenfroh). On peut aussi émulsionner les leucocytes (lavés) dans l'eau physiologique et chauffer une demi-heure à 55° ou 60°. Dans ces deux méthodes, l'eau physiologique pourrait être remplacée sans inconvénient par l'eau distillée. On peut la remplacer également par du sérum inactif; il y a même quelquefois avantage à procéder ainsi. Un autre moyen, indiqué par M. Schattenfroh, consiste à faire macérer 2-3 heures à 37° les leucocytes desséchés, puis triturés dans l'eau physiologique.

En soumettant les globules blancs à l'action de la leucocidine staphylococcique, M. Bail obtient un extrait qui supporte, comme ceux de M. Schattenfroh, des températures susceptibles de détruire les alexines du sérum. Nous citons cette méthode à titre de simple curiosité.

II. *Substances agglutinantes.*

Certains sérums normaux jouissent de la propriété d'agglutiner telle ou telle bactérie. Ainsi, le sérum de cheval agglomère les vibrions cholériques. Nous renvoyons au chapitre suivant, pour la technique qui devra être suivie dans l'étude des « agglutinines ».

III. *Phagocytose.*

L'*englobement des poudres inertes* est facile à obser-

ver chez les animaux à sang froid. On injecte, par exemple, une émulsion de cinabre dans le sac lymphatique dorsal de la grenouille : les leucocytes, porteurs de grains colorés, se rencontrent bientôt dans tous les espaces lymphatiques de l'organisme et dans le mucus du tube digestif. Si, avec Cohnheim, on cautérise ensuite la cornée de l'animal, on trouvera les leucocytes du pus cornéen remplis de particules de cinabre.

Quand on veut étudier l'*englobement* et la *digestion des cellules animales*, il suffit d'examiner en chambre humide de Ranvier de la lymphe de grenouille contenant quelques hématies. Après un ou deux jours, on trouvera que celles-ci ont été captées et plus ou moins complètement détruites. On peut aussi injecter divers éléments (spermatozoïdes, globules rouges d'une espèce différente) dans le péritoine des animaux à sang chaud et, à l'aide de prises successives, assister à l'incorporation de ces éléments et à leur disparition progressive.

L'*englobement* et la *digestion des microbes* seront observés soit *in vitro* soit (le plus ordinairement) *in vivo*.

Phagocytose in vitro. — Un procédé élégant, dû à M. Bordet, rend cette étude très facile. On se procure un exsudat péritonéal de cobaye (par injection de bouillon, pratiquée la veille) et on mélange des gouttes de cet exsudat à des gouttes d'émulsions bactériennes variées. Le tout est maintenu à 37°, en chambre humide. Après quatre heures, nombre de microbes sont déjà englobés. Les organismes restés libres n'offrent aucune modification anormale ; au contraire, beaucoup d'entre les organismes intracellulaires ont péri et montrent de profondes altérations. La mort, suivant les espèces étudiées, se traduit ou non par la transformation granulaire. Ainsi, les vi

brions et le bacterium du choléra des poules sont convertis en sphères plus ou moins arrondies, tandis que le bacille diphtéritique et le proteus conservent leur aspect extérieur. La digestion ultérieure est ou non précédée de transformation éosinophile.

Phagocytose in vivo. — Dans les infections, mortelles ou non, et chez les animaux, réfractaires ou vaccinés, il est facile de suivre les péripéties de la lutte entre les cellules phagocytaires et les microbes, soit en prélevant à plusieurs reprises des exsudats locaux (sous-cutanés, intra péritonéaux, intra-oculaires), soit, si on veut étudier ce qui se passe dans les différents viscères, en inoculant plusieurs animaux et en les sacrifiant à des temps variables, pour faire des coupes d'organes.

A) Dans le premier cas, nous recommandons les sujets d'étude suivants :

I. *Injection de vibrions cholériques dans le péritoine du cobaye neuf.* — 1° A dose non mortelle. On notera l'hypoleucocytose (locale) initiale, suivie d'hyperleucocytose ; puis, l'englobement des vibrions, qui se transforment en boules et se réduisent ensuite en grains éosinophiles. Jamais on n'assistera à une destruction extracellulaire. 2° A dose mortelle. On verra les vibrions se développer comme *in vitro*, sans que le péritoine réagisse par afflux leucocytaire. — *Injection de vibrions dans le péritoine du cobaye immunisé.* Mêmes phénomènes qu'avec la dose non mortelle chez un animal neuf, mais ici la réaction est encore plus énergique.

II. *Injection du bacille pyocyanique dans le péritoine du cobaye neuf.* — 1° A dose mortelle. On assiste aux effets de la leucocidine, dont nous avons déjà parlé. Le protoplasme des globules blancs devient transparent et le noyau vésiculeux. Les phagocytes étant ainsi détruits d'une façon brutale, le bacille

injecté se multiplie rapidement. 2° A dose non mortelle. On observe d'abord l'altération d'un certain nombre de leucocytes, puis la phagocytose s'établit. Les microbes englobés se transforment partiellement en boules. — *Injection du bacille pyocyanique dans le péritoine du cobaye immunisé.* Mêmes apparences que dans le cas précédent.

III. *Injection du saccharomyces de Curtis dans le péritoine du cobaye neuf.* — 1° A dose non mortelle. Après le stade obligé de phagolyse, on assiste à une phagocytose énergique. Tantôt les leucocytes englobent les cellules de levure, tantôt ils forment autour d'elles des « rosaces », véritables cellules géantes dont on peut suivre l'évolution ; 2° A dose mortelle. Phagocytose incomplète et tardive.

B) Nous ne pouvons insister davantage et nous signalerons maintenant quelques types d'étude, basés sur l'examen des coupes d'organes.

I. *Inoculation du bacille du rouget à la souris ou au pigeon.* — On notera tout spécialement le rôle phagocytaire des endothéliums des vaisseaux. Les préparations des viscères, colorées par la méthode de Gram, équivalent à de véritables injections des réseaux capillaires par le bleu de Prusse.

II. *Inoculation de la bactéridie charbonneuse dans les veines du lapin.* — Les coupes du foie montreront la lutte des cellules de Kupffer avec le bacille injecté.

III. *Inoculation du bacille tuberculeux humain dans les veines du lapin.* — Des préparations du poumon, faites à des temps variables après l'infection, permettront de suivre pas à pas l'évolution des lésions. On verra d'abord les bacilles englobés par les polynucléaires, puis par les mononucléaires. Les mononucléaires se transforment ensuite en cellules épithélioïdes, ou bien se fusionnent pour engendrer les cellules géantes.

CHAPITRE IV

IMMUNITÉ. — PRÉPARATION DES DIVERS SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES.

I. *Généralités.*

On doit distinguer l'immunité envers les microbes et l'immunité envers les toxines. Dans les deux cas, l'immunité peut être naturelle ou acquise.

Immunité naturelle. — 1° **Immunité contre les microbes.** — Son étude comporte, avant tout, le parallèle entre le rôle des humeurs et celui des phagocytes. On se rendra facilement compte qu'il n'existe aucun rapport entre le pouvoir bactéricide du sang et l'état réfractaire. On pourra, par exemple, constater que la bactéridie charbonneuse est tuée par le sérum du lapin (animal sensible) et pousse dans celui de la poule (animal réfractaire). On constatera, non moins aisément, que la phagocytose représente le moyen de défense par excellence de l'organisme, en inoculant, par exemple, la bactéridie dans le sac lymphatique dorsal de la grenouille. Les moyens de vaincre l'immunité naturelle ont été mentionnés ailleurs. 2° **Immunité contre les toxines.** — On choisira, comme types d'étude, le rat et la poule, respectivement immuns contre les poisons diphtérique et tétanique.

Immunité acquise. — Elle comprend l'immunité non spécifique et l'immunité spécifique, qui seule sera étudiée en détail dans ce chapitre.

1° **Immunité non spécifique.** — On l'obtient en

produisant une leucocytose générale ou locale par les moyens déjà indiqués.

2° **Immunité spécifique.** — Il en existe plusieurs variétés : *a*) l'immunité conférée par les microbes et les toxines ; *b*) l'immunité conférée par les sérums ; *c*) l'immunité conférée par l'hérédité ; *d*) l'immunité conférée par la lactation.

Immunité conférée par les microbes. — Nous étudierons bientôt les procédés mis en œuvre pour la produire. Lorsqu'on veut savoir, ici encore, quel rôle revient aux humeurs et aux phagocytes, les types d'expérience ne manquent pas. On note facilement que le sérum des animaux immunisés contre la bactéridie charbonneuse, le streptocoque, le pneumocoque, etc., ne jouit d'aucun pouvoir bactéricide vis-à-vis du microbe correspondant. On observe, d'autre part, l'influence exclusive des phagocytes, en injectant des vibrions cholériques ou des bacilles pyocyaniques dans le péritoine des cobayes immunisés (*ubi supra*) ; en injectant des streptocoques sous la peau d'un sujet rendu réfractaire, etc...

Immunité conférée par les toxines. — Nous étudierons aussi, dans un instant, la façon dont on l'obtient. On se rendra compte qu'elle ne réside pas dans le pouvoir antitoxique des humeurs, en immunisant, par exemple, un lapin avec des spores tétaniques pures, additionnées d'acide lactique (il faut procéder avec la plus grande prudence, pour ne pas amener la mort des animaux) ; le sérum du sujet ne devient nullement toxinicide, malgré l'état réfractaire produit (Vaillard).

Immunité conférée par les sérums. — Elle sera mentionnée en détail à propos de ceux-ci. Il est aisé de voir que, la plupart du temps, les sérums thérapeutiques ne jouissent d'aucune propriété bactéricide. Leur action sur la phagocytose sera mise en évidence

en étudiant, par exemple, l'exsudat péritonéal d'un lapin immunisé par le sérum anticharbonneux et infecté ensuite par la voie abdominale.

Immunité héréditaire. — Pour obtenir l'immunité héréditaire vraie, on immunisera fortement les femelles avant la conception. M. Vaillard a pris comme types d'étude les animaux immunisés à l'aide de la toxine tétanique, de la b. charbonneuse (vaccins pastoriens), du v. cholérique (cultures mortes) et du v. Metchnikowi (cultures vivantes).

Immunité conférée par la lactation. — La souris convient seule pour son étude. On peut l'immuniser, par exemple, avec la toxine tétanique et constater qu'elle transmet, par l'allaitement, l'immunité à des petits autres que les siens.

Nous nous occuperons uniquement dans ce qui va suivre des moyens d'immuniser et d'hyperimmuniser les animaux contre les microbes et les toxines, ainsi que des propriétés du sérum des animaux hyperimmunisés.

II. *Immunisation et hyperimmunisation contre les microbes et les toxines.*

On peut vacciner les animaux à l'aide des *microbes vivants*, des *microbes morts* ou des *toxines solubles*. Dans le premier cas, on a recours, tantôt à des cultures pleinement virulentes, tantôt à des cultures atténuées ou affaiblies. On se sert parfois aussi de produits pathologiques, employés tels quels ou préalablement modifiés, pour diminuer l'activité des germes. Dans le second cas, on a le choix entre les cultures mortes, les produits pathologiques stérilisés ou divers extraits des uns et des autres. Dans le troisième cas enfin, on s'adresse soit aux toxines normales, soit aux toxines modifiées.

Lorsqu'on fait usage de cultures virulentes ou de poisons normaux, on doit commencer par des doses très faibles et n'augmenter celles-ci qu'avec les plus grandes précautions. Toutefois, dans le cas des cultures, il est parfois possible d'injecter d'emblée une forte quantité de germes, lorsqu'il existe un mode d'inoculation qui permet de transformer l'infection mortelle en infection immunisante (vaccination de la péripneumonie à la queue, du charbon symptomatique dans les veines, etc...).

Non seulement il est possible d'immuniser les animaux contre les microbes et les toxines, mais on parvient souvent à les *hyperimmuniser*, c'est-à-dire à leur faire supporter les doses de plus en plus fortes. La résistance ainsi obtenue atteint parfois un degré étonnant.

Nous passerons en revue les principaux microbes vis-à-vis desquels on peut-être amené (soit dans les recherches de laboratoire, soit dans la pratique) à vacciner ou à hypervacciner les animaux ; nous indiquerons comment on réalise l'immunité contre ces organismes et leurs poisons et comment on prépare, par hyperimmunisation, les divers sérums thérapeutiques usités aujourd'hui.

Bactéries du genre pasteurella.

On sait que Pasteur a réussi à immuniser les poules contre le *choléra des poules* avec ses deux vaccins, inoculés à 12 jours d'intervalle ; l'expérience est facile à répéter. Nous ne connaissons guère d'autres moyens susceptibles de produire l'état réfractaire : l'emploi des cultures chauffées, en particulier, n'a donné que des résultats incertains aux auteurs.

C'est encore à l'aide de cultures atténuées par la méthode pastorienne qu'on a tenté, sans grand suc-

cès, semble-t-il, la *vaccination des porcs contre la pasteurellose qui leur est propre.*

Enfin, MM. Oreste et Armanni ont immunisé les buffles contre le *barbone* par le virus atténué et par le sang de pigeon infecté.

Bacille du hog-choléra.

On peut vacciner le lapin avec des doses croissantes de cultures. On peut aussi s'adresser au sang de lapin infecté, chauffé une demi-heure ou 1 heure à 54°-58° ; on fera 3 ou 4 inoculations, convenablement espacées, sous la peau ou dans les veines ; la quantité de sang employée sera d'environ 3 centimètres cubes dans le premier cas, 15 dans le second (Selander). Le sérum du lapin, prélevé 5 à 10 jours après l'épreuve par le virus virulent, se montre doué de propriétés thérapeutiques (Metchnikoff).

On a immunisé les porcs avec des cultures atténuées par la chaleur ou le vieillissement ; la méthode paraît encore bien imparfaite pratiquement.

Bacille du rouget.

Nous étudierons plus tard les divers moyens employés dans la vaccination des porcs en grand.

Pour hyperimmuniser les lapins, on leur inocule d'abord les vaccins pastoriens, puis le virus virulent à dose croissante (Mesnil). On peut aussi injecter successivement des cultures mortes, de vieilles cultures et des cultures jeunes ; en deux mois et demi l'animal supporte impunément l'inoculation intraveineuse de 15 à 20 centimètres cubes de bouillon virulent (Vallée). Le sérum des lapins devient thérapeutique ; injecté préventivement, il rend réfractaire la souris, le pigeon, le lapin ; mêlé au virus (à dose

plus forte), il en entrave l'action ; enfin, administré jusqu'à 12 heures et même 48 heures après l'infection, il en annule les effets (il faut ici une dose encore plus forte). Le sérum est agglutinant (Mesnil) mais non bactéricide.

On peut hypervacciner les porcs et les moutons, afin d'obtenir un sérum thérapeutique, mais il vaut mieux s'adresser au cheval. M. Leclainche emploie des cultures susceptibles de tuer le pigeon dans le pectoral à la dose d'un quart de centimètre cube. Il en inocule d'abord 200 centimètres cubes dans les veines du cheval, puis, tous les 5-10 jours, 500 centimètres cubes. L'animal réagit chaque fois par une élévation thermique de 2° et un peu d'abattement. Après quelque temps son sérum devient actif, comme l'indiquent les chiffres suivants : un quart à un huitième de centimètre cube immunise (pour 1-2 jours) le lapin contre l'injection intraveineuse de $0^{cc},5$ à 1 centimètre cube de virus et le pigeon contre l'injection intramusculaire de 1 centimètre cube. — 1 centimètre cube, mêlé à 1 centimètre cube de virus, donne au lapin une solide immunité sans le rendre malade ; $1^{cc},5$, mêlé à $0^{cc},5$ de virus, produit de la même façon l'état réfractaire chez le pigeon.

Bacille pyocyanique.

M. Wassermann a immunisé et hyperimmunisé comparativement des cobayes avec les cultures vivantes et la toxine. Ces expériences, aisées à reproduire, sont des plus intéressantes, car elles mettent en lumière la différence qui sépare l'immunité antimicrobienne de l'immunité antitoxique.

Les cobayes vaccinés par les microbes (dans le péritoine) résistent, par exemple, à 20 doses mortelles de microbes dans le péritoine, mais ne résistent pas à

2 doses mortelles de toxine, dans le péritoine ou sous la peau. Au contraire, les cobayes vaccinés par le poison (dans le péritoine) résistent à plusieurs doses mortelles de poison ou de microbes dans le péritoine.

Le sérum des cobayes hyperimmunisés par les microbes est préventif et un peu curatif vis-à-vis des microbes, mais il demeure sans action sur la toxine. Le serum des cobayes hyperimmunisés par le poison est préventif, antitoxique et franchement curatif vis-à-vis du microbe. Il est toutefois moins préventif que le sérum antimicrobien.

On peut hyperimmuniser le lapin par les cultures mortes (stérilisées à 115°), en injectant des doses croissantes sous la peau (Metchnikoff et Roudenko). Il est également facile d'hyperimmuniser la chèvre avec le virus vivant, par la voie sous-cutanée (Georghiewski).

Le sérum des animaux fortement immuns n'est pas bactéricide, mais, lorsqu'on ensemence le bacille pyocyanique dans ce sérum, il y pousse agglutiné et sans donner de pigment.

Vibrions cholériques.

En injectant des cultures, vivantes ou mortes, sous la peau ou dans le péritoine du cobaye, on rend aisément celui-ci réfractaire à l'inoculation intrapéritonéale de fortes doses de virus. De même pour le lapin. Ce procédé ne donne aucune résistance vis-à-vis de la toxine soluble. Au contraire, l'injection de toxine à dose croissante vaccine contre le poison et contre le microbe.

On a souvent hyperimmunisé les animaux de laboratoire à l'aide des vibrions cholériques, afin d'étudier les propriétés de leur sérum. Lorsqu'on choisit le cobaye, on inocule (dans le péritoine) d'abord des cul-

tures mortes, puis des cultures vivantes; à chaque injection les animaux réagissent par de l'hypothermie; il faut environ 3-4 mois pour avoir un sérum très actif (Pfeiffer). Les lapins jeunes et vigoureux fournissent par contre un sérum efficace, 5 à 6 jours après une seule inoculation de cultures mortes (Pfeiffer et Marx). La chèvre a été fréquemment employée; on lui injecte sous la peau des doses croissantes de cultures vivantes ou mortes (lorsqu'on se sert des cultures mortes, il vaut toujours mieux terminer par des inoculations de virus vivant); parfois les animaux présentent des abcès (stériles) sans danger.

Il est facile d'hyperimmuniser le cobaye ou la chèvre avec la toxine, difficile d'hyperimmuniser le lapin. Pour la préparation du sérum anticholérique, MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni se sont adressés au cheval. On commence par injecter 10 centimètres cubes de toxine et on renouvelle les inoculations tous les 8 à 10 jours, de telle façon qu'au bout de 6 mois l'animal supporte 200 centimètres cubes en une seule séance. Il faut procéder assez lentement et ne jamais introduire trop de poison au même point, sous peine de voir se produire des escarres.

Le sérum des animaux vaccinés par les microbes est préventif contre les microbes, sans effet sur la toxine. Le sérum des animaux vaccinés par le poison est préventif et curatif vis-à-vis de l'infection, de l'intoxication et du choléra expérimental vrai; il est moins préventif cependant que le sérum antimicrobien. Les deux sérums sont bactéricides et agglutinants.

Pour obtenir un sérum préventif (antimicrobien), il est inutile de pousser bien loin l'immunisation. Ainsi, le sérum d'un homme qui a reçu 1/10 de gélose, stérilisée par la chaleur, est préventif du 5e au 20e jour (Kolle). Pour obtenir un sérum agglutinant, il n'est pas indispensable que l'animal soit appelé à

devenir immun, il suffit qu'il soit infecté et que l'infection n'amène pas la mort trop vite.

Nous reviendrons sur les propriétés préventives, bactéricides et agglutinantes du « choléra-sérum », qui nous servira de type pour l'étude des sérums antimicrobiens.

Vibrio Metchnikowi.

M. Gamaleïa a vacciné les cobayes, les pigeons et les poulets à l'aide de cultures chauffées (cultures de 14 jours, dans le bouillon de pieds de veau, portées une demi-heure à 120°). Il faut procéder avec précaution et en plusieurs séances, lorsqu'on emploie la voie intramusculaire ; on réussit au contraire en une seule séance, *chez le cobaye*, par la voie sous-cutanée. On inoculera, en tout, environ 4 centimètres cubes au cobaye et 12 centimètres cubes au pigeon. D'après M. Gamaleïa, les animaux, devenus ainsi réfractaires au virus vivant, succombent lorsqu'on leur injecte la dose mortelle de cultures mortes. On parvient cependant à vacciner contre les microbes chauffés, mais inconstamment (Metchnikoff et Roudenko).

Le lapin ne peut être immunisé par les cultures mortes (Gamaleïa).

Bacille typhique.

En injectant au cobaye (sous la peau ou dans le péritoine) des cultures vivantes ou mortes, on le rend facilement réfractaire à l'inoculation intrapéritonéale de fortes doses de virus. D'après MM. Pfeiffer et Kolle, le cobaye se prête mal à l'hyperimmunisation avec les microbes. Il vaut mieux employer la chèvre ; on opère alors comme pour les vibrions cholériques (*ubi supra*); les abcès ne sont pas très rares encore dans ce cas.

Comme pour les vibrions également, on peut s'adresser aux lapins jeunes et vigoureux (Pfeiffer et Marx). Le chien donne de bons résultats ; on injecte d'abord des cultures en bouillon, puis des émulsions de cultures sur gélose (Löffler et Abel). Le cheval a servi aux expériences de M. Funck ; cet auteur lui inocule des cultures en bouillon de un mois à 6 semaines, stérilisées par le phénol, aussi bonnes, dit-il, que le virus vivant. Le sérum antimicrobien, obtenu par ces divers moyens, est préventif et agglutinant. Pour obtenir un sérum préventif, il suffit d'ailleurs d'injecter à l'homme 1 anse de gélose stérilisée par la chaleur ; 11 jours après, le sérum manifeste une activité marquée (Kolle); de plus, ce sérum est très agglutinant. Pour obtenir un sérum agglutinant, il suffit d'injecter sous la peau du cobaye 1 centimètre cube de culture fraîche en bouillon (le sérum agglutine après 3 jours) ou 2 centimètres cubes de culture en bouillon, chauffée trois quarts d'heure à 60° (le sérum agglutine après 5 jours).

M. Chantemesse, pour préparer un sérum antitoxique, a hypervacciné le mouton et le cheval, à l'aide du poison soluble découvert par lui. On inocule 5 centimètres cubes dans les veines du mouton ; 4 jours plus tard, on recommence ; puis on augmente peu à peu la dose. A chaque inoculation, l'animal réagit par une élévation thermique de 1°,5 à 2°,5 ; on observe à la longue de l'émaciation et souvent de la diarrhée. Le cheval se montre encore plus difficile à immuniser ; il est exposé à se cachectiser et à contracter des paralysies. Le sérum des animaux qui ont reçu la toxine est préventif (vis-à-vis du cobaye et du lapin), antitoxique (vis-à-vis du cobaye), et agglutinant.

Colibacilles.

On immunise ou hyperimmunise les animaux de

la même façon que pour le b. typhique. Ces animaux sont toujours vaccinés contre le colibacille *correspondant* (pas forcément contre les autres, jamais contre le b. typhique); leur sérum vaccine contre le colibacille *correspondant* (pas forcément contre les autres, jamais contre le b. typhique) et agglutine *ce même colibacille* (pas forcément les autres, jamais le b. typhique).

Pneumocoque.

On a vacciné et hypervacciné divers animaux avec les microbes vivants et les humeurs ou organes virulents; avec les cultures et produits pathologiques stérilisés; enfin, avec divers extraits des unes et des autres. Le sérum des animaux hyperimmuns est préventif et même curatif. Il est agglutinant, comme d'ailleurs le sérum des sujets simplement infectés, mais l'agglutination ne se manifeste que lorsqu'on fait une culture dans le sérum lui-même (Voir, 3e partie, Affections dues au pneumocoque).

Streptocoques.

M. Marmorek s'est proposé le premier de préparer en grand le sérum antistreptococcique et il a réussi à obtenir un *sérum très actif contre l'anasarque du cheval*. L'*efficacité* du sérum de Marmorek, *vis-à-vis des affections humaines* dues au streptocoque, a été contestée; elle est réelle cependant, mais susceptible de varier, selon la race de streptocoque qui occasionne la maladie en jeu. Aussi M. van de Velde a-t-il attiré l'attention sur la nécessité de préparer des *sérum polyvalents*, en inoculant aux animaux plusieurs espèces de streptocoques.

Quoi qu'il en soit, M. Marmorek, après avoir comparé

expérimentalement les cultures vivantes et les cultures mortes, a donné la préférence aux premières, dont il n'emploie que des échantillons extrêmement virulents, au moins lorsque l'immunisation est déjà assez avancée. Le lapin se prête mal aux recherches, à cause de sa grande sensibilité. Le mouton est long à vacciner ; il maigrit beaucoup après chaque injection de virus. L'âne se montre fort sensible. Le cheval, couramment employé pour la préparation en grand du sérum, ne peut être hyperimmunisé qu'à la longue ; on commence par de faibles doses et on a soin de ne jamais inoculer un animal incomplètement remis des suites d'une injection précédente. Lorsque le cheval a reçu une quantité suffisante de virus, on attend au moins 4 semaines pour le saigner. Le sérum obtenu n'est pas bactéricide; il se montre préventif et thérapeutique, au moins vis-à-vis du streptocoque correspondant.

Bacille de la peste.

Avec les cultures chauffées, on peut immuniser la souris, le cobaye, le lapin, le singe et l'homme (Haffkine). Voici quelques exemples : un lapin, qui a reçu une ou deux injections dans les veines ou dans le péritoine, ou, mieux encore, 3 ou 4 injections sous la peau (émulsions de gélose, chauffées une heure à 58°), est devenu réfractaire (Yersin, Calmette et Borrel). Un cobaye, qui a reçu 1 ou 2 centimètres cubes de vaccin Haffkine, une souris qui a reçu 1/2 centimètre cube du même vaccin, résistent après 8-10 jours à l'infection (Calmette). MM. Terni et Bandi ont obtenu d'excellents résultats chez le cobaye et le rat à l'aide de leurs exsudats chauffés, mentionnés antérieurement. Enfin, MM. Lustig et Galeotti, en employant l'extrait alcalin des cultures sur gélose,

ont réussi à immuniser la souris, le rat, le lapin et le singe.

Pour préparer le sérum antipesteux, il faut s'adresser au cheval. L'injection exclusive de cultures chauffées ne donne jamais un sérum bien actif; l'usage de l'extrait alcalin ne semble pas meilleur et il en va de même pour la toxine soluble (Roux). Les cultures vivantes seront donc préférées; toutefois, il convient de commencer par les cultures mortes. On tend aujourd'hui à combiner l'immunisation par la toxine soluble à l'immunisation par les bacilles vivants, mais il n'existe à cet égard aucun document circonstancié.

M. Roux inocule d'abord des cultures chauffées. Il injecte des doses faibles et n'augmente celles-ci que peu à peu, en laissant les animaux se rétablir complètement entre chaque inoculation. Les cultures vivantes ne sont employées que lorsque le sérum manifeste déjà des propriétés préventives. La seule voie usitée pendant la vaccination est la voie intraveineuse. Quand on juge que l'animal peut fournir un bon sérum, on le saigne, 15 à 20 jours après la dernière inoculation. Après la période des saignées, on réinocule des cultures vivantes pendant 4 semaines, on attend 15-20 jours, on saigne et ainsi de suite. Voici (d'après MM. Roux et Batzaroff, Calmette et Salimbeni), quelques chiffres, qui établissent l'activité du sérum antipesteux de l'Intitut Pasteur. $0^{cc},02$, injectés 24 à 48 heures avant l'infection, protègent la souris contre la dose de virus qui tue en 36 heures; $0^{cc},25$, injectés 14 heures après l'infection, empêchent la mort. — 1 à 2 centimètres cubes vaccinent le cobaye, 12 heures avant l'infection; 3 à 5 centimètres cubes empêchent la mort, 24 heures après celle-ci (voie sous-cutanée); enfin, 1 à 2 centimètres cubes immunisent contre l'ino-

culation intranasale (la plus sévère). — 2 centimètres cubes vaccinent le singe, 24 à 48 heures avant l'injection d'une dose qui tue en 5 jours; une quantité convenable de sérum, injectée dans les veines, empêche la mort, 3 jours même après l'infection. — 2 centimètres cubes, injectés dans les veines du lapin 16 heures avant l'inoculation intranasale, préviennent l'apparition de la pneumonie pesteuse.

Le sérum de Roux est préventif, thérapeutique et antitoxique. Nous étudierons plus tard son emploi, ainsi que celui des vaccins d'Haffkine.

Bactéridie charbonneuse.

La vaccination pastorienne, appliquée aux grands animaux, sera mentionnée ultérieurement. On peut immuniser le mouton à l'aide de sang virulent, chauffé pendant 40-60 minutes à 55°-58° (Roux et Chamberland). On peut aussi immuniser le mouton et le lapin avec des émulsions spléniques ou du sang, stérilisés par l'essence de moutarde (Roux). Cette « vaccination chimique » offre une grande importance théorique.

M. Marchoux confère au lapin une forte résistance en le traitant comme il suit. Il injecte d'abord 1/2 centimètre cube de premier vaccin; puis, 12 jours après, 1 centimètre cube. Au bout de 12 jours, il inocule 1/4 de centimètre cube de second vaccin; après 12 nouveaux jours, 1/2 centimètre cube. Il renforce ensuite l'immunité, en employant le virus virulent à doses progressives et arrive à faire supporter à l'animal 1 centimètre cube de culture *pro die* ou 20 centimètres cubes tous les 5 jours.

On pourrait commencer l'immunisation du lapin, comme l'ont indiqué jadis MM. Roux et Chamberland, en injectant 25 à 30 centimètres cubes de premier vaccin dans les veines; on réitère l'inoculation 8 jours

après et, au bout de 8 jours, on introduit 1/4 à 1/2 centimètre cube de second vaccin sous la peau.

M. Marchoux a utilisé avec avantage le mouton, afin d'obtenir un sérum actif. On inocule d'abord les 2 vaccins pastoriens, puis on injecte tous les 8 jours des quantités croissantes de virus (jusqu'à 300 centimètres cubes en une séance). L'animal réagit vivement à chaque inoculation. Il faut se méfier des injections intraveineuses, lorsqu'on arrive aux fortes doses. 15 jours à 3 semaines après la dernière inoculation, on saigne l'animal.

Le sérum anticharbonneux n'est pas bactéricide, mais il se montre préventif et curatif (surtout celui du mouton). Il faut employer comme animal d'expérience le lapin et non le cobaye (trop sensible).

M. Sobernheim a obtenu un sérum actif, en s'adressant également au mouton et en inoculant des émulsions de gélose à dose croissante. Il a pu vacciner les moutons neufs, à l'aide d'un mélange de second vaccin et de sérum, contre l'infection sous-cutanée et, plus facilement encore, contre l'infection digestive. Cette méthode ne saurait remplacer la vaccination pastorienne, mais elle est néanmoins fort intéressante.

Vibrion septique.

On peut immuniser le mouton et l'âne par injection intraveineuse de cultures ; le lapin supporte cette inoculation, mais n'est nullement vacciné : il périt en effet lorsqu'on vient à l'éprouver.

On peut immuniser le cobaye à l'aide des cultures filtrées, des cultures stérilisées et de la sérosité virulente filtrée (Roux).

MM. Leclainche et Morel rendent les cobayes réfractaires au moyen de vaccins préparés d'après le procédé indiqué par M. Arloing pour le charbon

symptomatique. Ces mêmes auteurs ont hyperimmunisé un âne, en employant successivement la sérosité virulente et les cultures en bouillon Martin. Le sérum de cet âne s'est montré préventif vis-à-vis du cobaye et du lapin et un peu curatif vis-à-vis du lapin. Il jouit de propriétés antitoxiques incontestables, car il neutralise le poison gangreneux par mélange. Enfin, il agglutine les cultures jeunes du v. septique instantanément au 30e, rapidement au 1500e et plus lentement (mais constamment) au 30000e.

Bacterium Chauvœi.

Nous indiquerons plus tard comment on vaccine les bovidés par le procédé Arloing et par la méthode Leclainche et Vallée. Ces animaux peuvent être aussi immunisés avec le virus virulent, injecté dans les veines, dans la trachée et même à l'extrémité de la queue (à faible dose).

M. Roux a vacciné les cobayes au moyen des cultures stérilisées et de la sérosité filtrée. M. Dünschmann a également réussi, en se servant du second de ces procédés. Le même auteur hyperimmunise les lapins par des injections répétées de sang charbonneux et obtient ainsi un sérum préventif et antitoxique. MM. Leclainche et Vallée rendent aisément les cobayes réfractaires, à l'aide des vaccins lyonnais modifiés.

M. Kitt a hypervacciné le cheval, le bœuf, le mouton et la chèvre, par des inoculations de virus, d'abord intraveineuses, puis sous-cutanées Le cheval et le mouton constituent les animaux de choix ; ils fournissent un sérum préventif (pour le mouton, la chèvre et le bœuf) et curatif dans les cas lents. M. Arloing, en hypervaccinant des bœufs, a produit

un sérum préventif à l'égard des bovidés et du mouton et curatif à l'égard du mouton.

MM. Leclainche et Vallée ont hyperimmunisé une chèvre par le procédé de Kitt (macérations de muscles infectés) et un cheval par les inoculations intraveineuses de cultures. Le sérum de ces animaux s'est montré préventif, mais non curatif vis-à-vis du cobaye. L'action préventive est d'ailleurs inconstante et les sujets qui ont résisté ne possèdent pas d'immunité durable.

Le sérum du cheval fortement immun agglutine les cultures jeunes du b. Chauvœi instantanément à un titre très variable (1/3 à 1/3000) et plus lentement à un taux toujours élevé (1/3000 à 1/60000).

Les cobayes, immunisés contre le b. Chauvœi à l'aide des cultures ou du sérum anti charbonneux, succombent à l'inoculation du vibrion septique ; et *vice versa*. D'autre part le sérum anticharbonneux n'agglutine le vibrion septique qu'au 30e, et le sérum antigangreneux n'agglomère le b. Chauvœi qu'au même titre. Ces caractères permettent de séparer complètement les deux microbes.

Bacillus botulinus.

MM. Kempner et Schepilewski n'ont pu réussir à vacciner le cobaye et le lapin avec le poison botulique. Ils ont, par contre, hyperimmunisé une chèvre et celle-ci a fourni un sérum préventif, antitoxique et curatif.

Bacille diphtérique.

Généralités. — On peut immuniser les animaux de laboratoire avec les bacilles diphtériques, vivants ou morts, et avec la toxine.

Nous rappellerons simplement, comme exemples de vaccination par les bacilles, les procédés de Bardach (cultures virulentes, à doses croissantes), de Behring et Kitasato (cultures additionnées de trichlorure d'iode), d'Aronson (cultures atténuées par le formol), de Fränkel (cultures chauffées à 70°), de Brieger et Wassermann (cultures en bouillon de thymus, chauffées à 65°-70°). Ces procédés, d'une application en général délicate, ont permis de vacciner le cobaye, le lapin et le chien ; ils sont sans intérêt pratique. L'immunisation des petits animaux à l'aide de la toxine (Roux) offre une bien autre importance, car elle a conduit à la vaccination des grands animaux et à la préparation, aujourd'hui classique, du sérum antidiphtérique. On réussit à immuniser les petits animaux, le lapin par exemple, en injectant tout d'abord de la toxine additionnée d'un tiers de liquide de Gram. On inocule 1/2 centimètre cube du mélange et on recommence au bout de quelques jours. Après plusieurs semaines de ce traitement, on augmente la dose, ou bien on diminue la proportion de la solution iodo-iodurée. Finalement, on injecte le poison pur. Il faut procéder avec ménagement, en surveillant attentivement le poids des animaux.

Le mouton, la chèvre et la vache sont délicats à immuniser ; les femelles en lactation, fortement vaccinées, fournissent un lait antitoxique.

Nous étudierons en détail la préparation et le titrage du sérum antidiphtérique.

Préparation du sérum antidiphtérique. — On s'adresse exclusivement au cheval. L'animal est choisi avec soin et on s'assure, par l'épreuve de la malléine, qu'il n'est pas atteint de morve. On injecte d'abord une faible quantité de toxine, par exemple 1/4 de centimètre cube, pour tâter la susceptibilité du sujet (il y a des chevaux qui réagissent déjà nettement

avec cette dose, tandis que d'autres supportent d'emblée 2, 5, et même 10 centimètres cubes de poison diphtérique). Puis on augmente peu à peu la quantité inoculée. Il est impossible de donner à cet égard des chiffres, même approximatifs, tant est variable (au début) la réceptivité des chevaux. On renouvelle les injections à quelques jours d'intervalle, en surveillant la réaction générale, la température et l'œdème local. On arrive ainsi à faire supporter, en une fois, 100, 150 et même 200 centimètres cubes de poison. Certains auteurs préfèrent la voie sous-cutanée, d'autres la voie intraveineuse. M. Roux a établi que, dans tous les cas, de petites doses répétées valent bien mieux, au point de vue de l'activité du sérum, que de fortes doses espacées. Lorsque le cheval a reçu environ 1 500 centimètres cubes de toxine (ce qui demande 2 mois 1/2 à 3 mois), on le saigne et on titre son sérum, qui peut généralement être déjà employé dans le traitement des diphtériques. Après une période de saignées durant 8 à 10 jours et pendant laquelle on prélève facilement 10 litres de sang, on fait une nouvelle série d'injections de cultures filtrées. En 20 jours, par exemple, on en inoculera 1 litre. Il est bon de procéder ainsi : 25 centimètres cubes, 50 centimètres cubes, 75 centimètres cubes, 100 centimètres cubes et ensuite 100 centimètres cubes (chaque fois), jusqu'à la dernière séance, où on injecte 150 centimètres cubes. On pratique les injections tous les 2 jours; puis, la série terminée, on attend 10 à 12 jours, on saigne à nouveau, et ainsi de suite.

Pour recueillir le sérum, on laisse le sang se coaguler et on se comporte comme il a été indiqué dans la première partie de cet ouvrage. Il faut que les manipulations soient faites avec grand soin, car on ne doit jamais se servir d'antiseptiques. Si l'on possède plusieurs chevaux, il est indiqué de mélanger

leurs sérums avant de pratiquer le titrage. Lorsque le sérum possède un pouvoir préventif de 50000 au moins (méthode de Roux), ou une valeur minima de 100 unités antitoxiques par centimètre cube (méthode d'Ehrlich) il peut être utilisé ; sinon, on le rejette.

Le sérum est réparti, en flacons bien fermés, par doses de 10 ou 20 centimètres cubes et chauffé à 58°, pendant un temps variable selon les auteurs. L'un de nous avait déjà mis en œuvre ce chauffage dès 1896 et constaté qu'en le prolongeant pendant 2 heures on n'affaiblit nullement la propriété antitoxique. Le chauffage diminue l'abondance des coagulations secondaires qui apparaissent tôt ou tard dans le sérum. De plus, pour certains savants, il diminuerait aussi la fréquence des accidents post-sérothérapiques (d'ailleurs assez rares et toujours bénins). Pour réduire au minimum les coagulatious qui se produisent toujours, malgré le chauffage, l'un de nous a coutume de maintenir le sérum dans une glacière (en évitant toutefois l'humidité).

Il est souvent avantageux, pour la conservation et surtout pour l'expédition au loin, de préparer du sérum sec. On procède à la dessiccation dans le vide, sur l'acide sulfurique et à la température de 30°. Cette dessiccation réduit le sérum au 10e environ de son poids ; on le régénérera donc en le dissolvant dans 9 parties d'eau stérile. Les quelques considérations techniques que nous venons de mentionner s'appliquent à tous les sérums thérapeutiques. Ajoutons, pour ce qui concerne le sérum antidiphtérique, que, d'après M. Martin, l'injection d'une toxine 10 fois plus forte ne permet d'obtenir qu'un sérum deux fois plus actif.

Le sérum antidiphtérique est préventif contre l'infection ou l'intoxication expérimentales, anti-

toxique par mélange avec le poison diphtérique et curatif contre l'infection ou l'intoxication expérimentales. Nous n'avons pas besoin de rappeler qu'il est préventif et curatif vis-à-vis de la diphtérie humaine.

Titrage du sérum antidiphtérique. — Nous ne saurions mieux faire que de reproduire *textuellement* le résumé de la communication faite par M. le Dr Roux au Xe Congrès international d'hygiène et de démographie (résumé rédigé par l'auteur lui-même).

« Au début des études sur le sérum antidiphtéri-
« que, on mesurait l'activité de ce sérum en déter-
« minant son pouvoir préventif et son pouvoir
« curatif.

« On disait que le pouvoir préventif est de 50 000,
« lorsqu'un centième de centimètre cube de sérum
« préservait un cobaye de 500 grammes contre une
« dose de toxine diphtérique tuant, en 36-40 heures,
« un cobaye témoin du même poids. Le rapport
« entre le poids de l'animal (500) et la quantité de
« sérum employé ($0^{cc},01$) mesurait le pouvoir pré-
« ventif de l'antitoxine.

« Le sérum était injecté aux animaux douze heures
« avant la toxine. Tout cobaye qui, après 4-6 jours,
« n'avait pas perdu de poids, était considéré comme
« préservé.

« De même, on estimait le pouvoir curatif d'après
« la quantité de sérum nécessaire pour empêcher la
« mort de cobayes, d'un poids connu et qui avaient
« reçu, six heures avant, une dose de toxine faisant
« périr, en 36-40 heures, les cobayes témoins. Les
« cobayes encore vivants le sixième jour étaient
« considérés comme guéris. Ainsi, le pouvoir curatif
« d'un sérum était de 1000, si $0^{cc},05$ de ce sérum
« sauvait un cobaye de 500 grammes, dans les condi-
« tions que nous venons de dire.

« L'épreuve pouvait aussi être faite avec des « microbes vivants au lieu de toxine.

« Cette méthode d'appréciation de la valeur d'un « sérum n'est exacte que si les essais sont faits sur « un nombre d'animaux suffisant. Comme l'activité « de la toxine varie parfois au bout d'un temps assez « court, il faut avoir dans chaque expérience un « certain nombre d'animaux témoins.

« MM. Behring et Ehrlich ont recommandé un « autre procédé de titrage de l'antitoxine comme « plus simple et plus précis.

« Ce procédé repose sur la saturation, in vitro, de « la toxine par l'antitoxine équivalent à équivalent. La « valeur d'un sérum est mesurée par la quantité de « la toxine qu'il neutralise dans le verre à expérience. « Tout d'abord on détermine la quantité de toxine « qui tue un cobaye de 250 à 300 grammes dans « un délai de 3 à 5 jours. Cette quantité de toxine (*t*) « est prise comme unité toxique ; c'est la dose mor- « telle.

« Ensuite, on cherche la quantité de sérum (I) « qui, ajoutée à 100 doses mortelles, donne un mé- « lange neutre pour le cobaye, c'est-à-dire qui ne « cause ni œdème local, ni diminution de poids aux « cobayes qui le reçoivent sous la peau.

« L'unité immunisante (I) est la quantité de « sérum qui neutralise 100 doses toxiques. Un « sérum dont $0^{cc},01$ neutralise 100 doses mortelles, « renferme 100 unités immunisantes (100 I) par « centimètre cube.

« Il suffit donc d'avoir une provision de toxine- « étalon pour être en mesure de titrer tous les sérums « donnés.

« Mais l'activité de la toxine étalon n'est pas « constante, elle diminue peu à peu ; si au début, « par exemple, un centimètre cube contenait 100

« doses mortelles, après quelques mois, un centi-
« mètre cube n'en contient plus que 75. Pour avoir
« 100 doses mortelles il faut donc $1^{cc},33$ de cette
« toxine vieille. La quantité de sérum (I) qui neu-
« tralisait 1 centimètre cube de la toxine primitive,
« soit 100 doses mortelles, devrait neutraliser aussi
« 100 doses mortelles de la toxine affaiblie, soit
« $1^{cc},33$. M. Ehrlich a vu qu'il n'en est rien et que
« l'unité immunisante (I) neutralise toujours 1 cen-
« timètre cube de la vieille toxine comme il neutra-
« lisait 1 centimètre cube de la toxine primitive. Il
« semble que la toxine se soit transformée en une
« substance qui a conservé son pouvoir neutralisant
« pour l'antitoxine tout en perdant son pouvoir
« toxique.

« De cette observation, M. Ehrlich a déduit, avec
« une admirable sagacité, la composition des cul-
« tures filtrées du bacille diphtérique.

« Elles ne renferment point seulement la toxine
« proprement dite mais d'autres substances voisines
« non toxiques (toxoïdes) ou peu toxiques (toxones),
« mais capables de s'unir à l'antitoxine. La toxone
« et la toxine existent dans le liquide de culture
« récemment filtré ; car toutes deux sont élaborées
« par le bacille diphtérique ; mais, à mesure que ce
« liquide vieillit, la toxine se transforme en toxoïdes.
« Puisque ces dernières ne sont pas nuisibles aux
« animaux le liquide est devenu moins actif sur eux
« et cependant il neutralise toujours la même quan-
« tité d'antitoxine. En effet, pour M. Ehrlich, la
« toxine proprement dite est formée d'une substance
« très stable (haptophore) et d'une autre plus fragile
« (toxophore). Cette dernière est modifiée et il reste
« dans la vieille toxine, la partie haptophore. Or,
« celle-ci seule a de l'affinité pour l'antitoxine et
« c'est pour cela que le pouvoir neutralisant ne

« change pas en même temps que le pouvoir toxique.

« Comme les proportions de toxine, de toxone, « de toxoïdes varient dans les cultures filtrées avec « les microbes qui les élaborent et aussi avec le « temps, on comprend pourquoi un même volume « de sérum ne neutralisait pas toujours le même « nombre de doses mortelles quand on opérait sur « des poisons diphtériques de diverses origines et « pourquoi le même sérum titrait 100 unités immu- « nisantes avec la toxine A, 150 avec la toxine B, et « 50 seulement avec la toxine C.

« La toxine, les toxoïdes et la toxone renferment « toute la substance haptophore, elles ont donc la « même affinité pour l'antitoxine, c'est-à-dire que « toxine, toxoïde et toxone saturent l'antitoxine « équivalent à équivalent, mais elles n'ont pas la « même avidité. La toxine est plus avide d'anti- « toxine que la toxone et les toxoïdes ont une avi- « dité, soit supérieure, soit égale à la toxine. De « sorte que, si, à un mélange de toxine, toxoïde et « toxone on ajoute peu à peu de l'antitoxine, celle-ci « saturera d'abord les toxoïdes de la toxine puis la « toxone.

« Le nombre de doses mortelles saturées par « l'antitoxine ne mesure qu'une partie de la capa- « cité fixatrice de celle-ci ; elle nous indique la « puissance relative du sérum et non sa puissance « absolue. C'est cette dernière que M. Ehrlich « utilise dans son dernier procédé d'estimation du « sérum antidiphtérique. A la toxine-étalon il « substitue une antitoxine-étalon plus facile à conser- « ver à l'état sec, et qui servira ensuite à titrer tous « les autres sérums.

« Dans un volume de poison diphtérique renfer- « mant 100 doses mortelles (100 *t*), versons « peu à peu le sérum, de manière à obtenir un

« mélange tout à fait neutre pour les cobayes. Ce « mélange neutre contient une quantité de toxine L° « (limite O) et de sérum I, il est représenté par « I + L° et ne contient ni toxine ni antitoxine « libres. Si on y ajoute une dose de toxine on devrait « obtenir un mélange mortel L + tuant le cobaye, « En réalité, pour avoir le mélange mortel L + il « faut ajouter non pas une dose mortelle, mais un « certain nombre de doses mortelles, parce que la « toxine introduite déplace les toxones et ne se « manifeste que lorsqu'elle s'est substituée à tous les « équivalents de toxone combinés à l'antitoxine. « La différence D entre L° et L + n'est jamais un *t*, « mais un nombre de *t* plus ou moins grand sui- « vant la toxine employée.

« Ces déterminations faites on appréciera la valeur « d'un sérum donné en le comparant au sérum- « étalon au moyen d'une toxine quelconque. Il suf- « fira de déterminer L + d'une part avec le « sérum-étalon et d'autre part avec le sérum à « titrer.

« La méthode de mensuration de M. Ehrlich a « été généralement adoptée et aujourd'hui tous les « sérums sont évalués en unités immunisantes. Elle « apportait dans la posologie des antitoxines une « précision toute nouvelle qui a séduit les méde- « cins.

« En admettant complètement les idées de « M. Ehrlich la mesure des unités immunisantes « n'est exacte que si L° est rigoureusement déterminé. « M. Ehrlich a insisté sur les précautions à prendre « dans cette opération. On se servira de cobayes de « 250 à 300 grammes aussi comparables que pos- « sible ; on jugera de l'existence ou de la non-exis- « tence de l'œdème, non seulement par le palper « mais aussi en sacrifiant quelques animaux. Même

« en se conformant à toutes ces prescriptions, la « détermination de L° n'est pas facile et on peut se « demander si jamais on obtient un mélange réelle- « ment neutre.

« M. Danysz a fait, à ma demande, quelques expé- « riences sur le sujet. Il a préparé un mélange de « toxine et de sérum tout à fait sans action sur les « cobayes ; d'après les idées de M. Ehrlich ce mé- « lange ne contient ni toxine, ni antitoxine libres. « Cependant il fait périr les petits oiseaux avec tous « les signes de l'empoisonnement diphtérique. Le « résultat est encore le même si on diminue un peu « la proportion de toxine.

« M. Danysz a constaté aussi, à diverses reprises, « qu'un mélange neutre pour les cobayes conservés « dans les conditions ordinaires à 15°-20° tuait les « cobayes exposés au froid humide à 2°,5 au-dessus « de zéro.

« De sorte que I + L° est neutre pour les cobayes « et ne l'est pas pour les petits oiseaux ; il ne l'est « pas non plus pour les cobayes refroidis.

« Lorsqu'on détermine L°, on suppose que les « mélanges de toxine et d'antitoxine injectés n'ont « aucune action sur les animaux, et on admet que « ceux-ci périssent dès qu'il y a dans le liquide une « dose mortelle libre. Une expérience de M. Danysz « montre que l'organisme n'est pas indifférent à ces « mélanges que la théorie regarde comme sans « effet.

« Deux séries A et B de cobayes reçoivent des « mélanges contenant toujours la même quantité « d'antitoxine et des quantités croissantes de toxine. « La série A est laissée telle qu'elle et les animaux « de la série B reçoivent, en outre, 24 heures après « l'injection des mélanges, une dose de toxine qui « tue les témoins en 3 à 5 jours :

	SÉRIE A	SÉRIE B	
N° 1.	S + 500 doses, mort.	Pas de symptômes. .	Mort en 7 jours.
2.	S + 510 — —	Symptômes légers. .	— 7 —
3.	S + 520 — —	— plus graves.	— 6 —
4.	S + 540 — —	Mort en 6 jours. . .	— 6 —
5.	S + 550 — —	— 5 — . . .	— 6 —
6.	S + 565 — —	— 7 — . . .	— 3 —
7.	S + 580 — —	— 4 — . . .	— 3 —
8.	S + 600 — —	— 3 — . . .	— 3 —

« En considérant les cas 2 à 5, on voit que les « mélanges même toxiques ont amené un retard dans « la mort.

« Quand on fait la même expérience avec de la « *toxine tétanique* on obtient des résultats analogues « et les symptômes observés dans les cas 2 et 3 « (série A) sont ceux d'un tétanos léger.

« Ce qui précède montre que les mesures faites « avec le plus grand soin n'ont peut-être pas toute « la précision que l'on croit. Mais l'inconvénient se- « rait mince, pourvu que la méthode d'évaluation « employée nous indique, d'une façon certaine, les « sérums les plus efficaces pour guérir la diphtérie. « La chose importante est, en effet, de guérir les « malades ; et ce qu'il faut exiger d'un procédé de « mensuration, c'est de nous renseigner exactement « sur le pouvoir thérapeutique des antitoxines.

« Examinons à ce point de vue deux sérums titrés « au moyen de l'antitoxine-étalon de M. Ehrlich. « L'un, A, titre 700 unités ; l'autre, B, 200 unités « immunisantes. Essayons comparativement leur « pouvoir curatif et leur pouvoir préventif.

« M. Momont a trouvé que le pouvoir préventif de « A était de 150 000 et celui de B de 200 000. B pré- « servait donc les cobayes aussi bien que A, malgré « que son pouvoir antitoxique fût trois fois moindre.

« Pour estimer le pouvoir curatif, M. Danyz in-

« jecte à deux séries de cobayes de même poids, une
« dose de toxine diphtérique tuant les cobayes té-
« moins en 3-5 jours, puis, trois heures après, il
« donne à une série des doses variables du sérum A
« et à l'autre des doses égales du sérum B. Il constate
« que 10 unités du sérum A produisent le même
« effet que 2 unités du sérum B.

« En se rapportant aux unités immunisantes on
« aurait attribué au sérum A une valeur trois fois
« supérieure à celle du sérum B ; en réalité c'est le
« sérum B qui a le mieux guéri les cobayes.

« MM. Martin, Momont et Prévot, ont examiné à
« diverses reprises le pouvoir préventif du sérum
« d'une série de chevaux immunisés ; en même temps
« ils mesuraient leur pouvoir antitoxique. Ils ont pu
« voir que le maximum du pouvoir préventif ne coïn-
« cidait pas avec le maximum du pouvoir antitoxique.

« Il semble donc intéressant de poursuivre des expé-
« riences pour savoir si le pouvoir thérapeutique est
« exactement mesuré par les unités immunisantes.
« S'il en est ainsi il n'y aura rien à changer aux pro-
« cédés d'évaluation actuels, s'il en est autrement il
« faudra les modifier. Nous devrons toujours à la mé-
« thode de M. Ehrlich une admirable série de recher-
« ches sur la composition de la toxine diphtérique. »

Bacille tétanique.

MM. Roux et Vaillard ont réussi à immuniser les lapins contre le tétanos, en leur injectant des spores pures (c'est-à-dire débarrassées de toxine par un chauffage de 3 heures à 80°), additionnées d'une petite quantité d'acide lactique. MM. Behring et Kitasato ont également employé les cultures, mais en les mêlant avec le trichlorure d'iode. Aujourd'hui on s'adresse exclusivement à la toxine. MM. Roux et Vail-

lard ont vacciné les lapins avec la toxine iodée, d'après le procédé que nous avons indiqué à propos de l'immunisation par le poison diphtérique ; il faut aller encore plus prudemment que dans ce dernier cas. On peut hypervacciner de même le mouton et la vache (la vache laitière fournit un lait antitoxique) ; mais, pour préparer le sérum antitétanique, on se sert exclusivement du cheval. On commence par injecter un mélange de toxine et de liquide de Gram (*ââ*), à la dose d'un demi-centimètre cube, puis on diminue peu à peu la proportion de la solution iodo-iodurée, en même temps que l'on augmente la quantité totale de liquide inoculé. Il ne faut faire usage de toxine pure que lorsque le sérum du cheval manifeste déjà des propriétés antitoxiques. La voie intraveineuse est préférable à la voie sous-cutanée, dès qu'on vient à injecter le poison pur ; elle permet d'éviter les inconvénients de la réaction locale, parfois très marquée. Lorsque le cheval a reçu une quantité de culture filtrée équivalant à environ 500 centimètres cubes, ce qui demande à peu près 3 mois, on le saigne et on titre son sérum (méthode de Roux) ; ce sérum offre d'ordinaire un pouvoir voisin d'un million. Après la période de saignées, on fait une nouvelle série d'injections. En 20 jours, on inoculera, par exemple, 1 litre de toxine (toujours par la voie intraveineuse) ; puis on attend 10-12 jours, on saigne à nouveau et ainsi de suite. Pour le reste de la technique, nous renvoyons au chapitre précédent.

Le sérum antitétanique est préventif et antitoxique, mais son pouvoir curatif demeure malheureusement faible. On sait que MM. Roux et Borrel ont réussi à guérir le tétanos déclaré du cobaye par inoculation intracérébrale d'antitoxine ; cette méthode intéressante ne réussit pas d'ordinaire aussi régulièrement chez les autres espèces animales.

M. Vaillard a montré que la poule, animal réfractaire au poison tétanique, fournit un sérum actif quand on lui inocule à 2 ou 3 reprises 20 centimètres cubes de toxine dans le péritoine.

Virus de la peste bovine.

Nous parlerons plus tard de la vaccination par la bile. Nous indiquerons ici, d'après les travaux faits par l'un de nous avec le vétérinaire Adil-bey, la préparation et les propriétés du sérum antipestique.

Préparation du sérum. — Pour obtenir le sérum, on peut s'adresser à des bovidés guéris de la maladie naturelle ou immunisés par n'importe quel moyen. Quel que soit leur âge, quelle que soit leur race, il suffit de leur injecter en une fois, ou coup sur coup — selon la quantité de virus dont on dispose — 4 à 8 litres de sang pestique.

Il est bien plus simple encore de pratiquer l'immunisation et l'hyperimmunisation en une seule séance. On injecte alors 4 litres de virus et 25 centimètres cubes de sérum ; 15 jours après, le sérum de l'animal est devenu préventif à la dose de 25 centimètres cubes. Au lieu de 4 litres on peut en inoculer 8 ; le sérum sera alors plus actif.

Quinze jours après l'injection virulente massive (ou après la dernière injection, si l'on a opéré en plusieurs séances), on saigne l'animal. Pendant 4 à 5 semaines, on continue à prendre du sang tous les 5 à 6 jours ; cela fait 6 saignées. Le sérum de la sixième saignée ne diffère pas comme activité de celui de la première. Tous les sérums des animaux qui ont reçu 4 litres de virus paraissent absolument de même force : jamais on ne constate de différence appréciable. Toutefois, il est plus prudent de les mélanger et de les

titrer exactement. Ce titrage peut se faire de diverses façons ; l'inoculation simultanée, préconisée par MM. Kolle et Turner, nous paraît la meilleure.

Après la sixième saignée, on injecte à nouveau 4 litres (ou plus) et l'on saigne au bout de 15 jours. Et ainsi de suite. A chaque série d'inoculations, les animaux réagissent par une élévation thermique sans gravité dont la durée, parfois très courte, ne dépasse jamais une dizaine de jours. Le sérum devient plus actif à mesure que l'animal est depuis plus longtemps soumis aux inoculations.

Le sérum, additionné d'un quart pour 100 d'acide phénique, se conserve parfaitement sans perdre ses propriétés thérapeutiques.

Il nous reste à dire quelques mots de la récolte du virus qui sert à l'immunisation. Après avoir infecté les animaux, on recueille leur sang au moment où commence l'hypothermie, c'est-à-dire le 9e ou le 10e jour (en général le 9e). Le virus, ainsi obtenu, ne contient pas d'impuretés ; aussi peut-il être injecté à doses massives sans jamais produire d'abcès.

La saignée (à blanc) se pratique dans la carotide ; on reçoit le sang dans un bocal contenant une solution concentrée de citrate de potasse. Cette solution est calculée de telle façon que la proportion du sel anticoagulant atteigne 3 pour 100. Le sang citraté remplace avantageusement le sang défibriné ; nous avons constaté qu'il donne exactement les mêmes résultats au point de vue de l'hyperimmunisation.

On doit rejeter absolument le sang des animaux qui ont présenté des signes de fièvre du Texas ; mais on peut être obligé d'employer du virus qui contient le piroplasma.

Inutile de dire que l'injection du sang pestique doit se faire aseptiquement ; la majorité des animaux résorbent rapidement le sang pendant un certain

temps, mais, peu à peu, la résorption devient plus lente. Pour parer aux inconvénients qui en résultent, nous remplaçons maintenant le sang citraté par le liquide de lavage péritonéal. Voici comment on prépare ce liquide. Lorsqu'un animal de passage commence à présenter de la diarrhée, on lui injecte, dans le péritoine, un mélange préparé en étendant de 3 volumes d'eau physiologique un volume de solution, légèrement alcaline de peptone Martin (obtenue par autodigestion de la caillette de veau). Le mélange, préalablement porté à 37°, est introduit dans la séreuse, à la dose de 6 litres pour un veau d'un an (on augmente ou diminue la quantité, en proportion de la taille du sujet). Après 3 heures au moins, l'animal est sacrifié par hémorragie et l'on puise proprement le liquide intra-abdominal. Celui-ci, d'aspect citrin, se coagule rapidement dans les vases où il est reçu. On égoutte aseptiquement le caillot (volumineux, mais très léger) et on injecte le liquide clair qui en exsude. Le liquide de lavage péritonéal représente un virus parfaitement actif et d'une résorption excessivement rapide.

Propriétés du sérum. — Nous y reviendrons ultérieurement. Qu'il nous suffise de dire que l'on peut vacciner les animaux en leur injectant le sérum puis le virus ou bien le sérum et le virus (en deux points séparés — méthode de Kolle et Turner). On peut également guérir les animaux infectés, mais les chances de réussite décroissent à mesure qu'on s'éloigne du début de la période ébrile.

III. *Propriétés du sérum des animaux hyperimmunisés.*

Il faut distinguer entre les *sérums antimicrobiens* et les *sérums antitoxiques*.

SÉRUMS ANTIMICROBIENS

Ils sont préventifs contre les microbes, rarement contre les toxines (sérum antipesteux). Cette propriété se manifeste quand on injecte le serum 12 heures avant le virus. Elle se manifeste, souvent aussi, quand on inocule le sérum et le virus mêlés, ou bien le sérum et le virus en deux points différents; mais il faut employer une quantité de sérum plus forte que dans le cas précédent. *Certains* sérums *sont curatifs* jusqu'à une période plus ou moins éloignée du début de l'infection, mais à dose toujours considérable. *Plusieurs* sérums antimicrobiens *jouissent de la propriété d'agglutiner* les organismes correspondants. Enfin, les *sérums antivibrionniens transforment les vibrions en granules,* les tuent et pourraient même les dissoudre partiellement. Ceci nous amène à dire un mot du phénomène de Pfeiffer, expérience des plus intéressantes et que l'on aura souvent l'occasion de répéter.

Phénomène de Pfeiffer. — Quand on inocule une émulsion de vibrions dans le péritoine des cobayes hyperimmunisés, on observe, d'après M. Pfeiffer, le phénomène suivant : les vibrions sont immobilisés, se transforment en granules et se dissolvent. Quand on inocule la même émulsion, mêlée à du sérum anticholérique (choléra-sérum), dans le péritoine d'un cobaye neuf, les apparences sont identiques, mais, de plus, les vibrions se réunissent parfois en amas. Il y a donc à la fois un phénomène bactéricide et un phénomène agglutinant. Nous allons étudier successivement les *propriétés bactéricides du choléra-sérum* et les *propriétés agglutinantes de ce sérum (et de plusieurs autres).*

Propriétés bactéricides (choléra-sérum).

Le choléra-sérum et les sérums antivibrionniens jouissent seuls (parmi les sérums spécifiques) d'un pouvoir bactéricide marqué. Ils transforment non seulement *in vivo* mais encore *in vitro* (Bordet) les vibrions en granules et en tuent un certain nombre (la dissolution ultérieure est contestée par plusieurs auteurs). Des expériences, faciles à faire, démontrent ce qui suit. Le choléra-sérum frais, mêlé aux vibrions, les convertit en granules (et les agglutine). Le choléra-sérum, vieux ou chauffé 1/2 heure à 55°, ne modifie plus la forme des vibrions (mais il les agglomère parfaitement). Le choléra-sérum vieux ou chauffé, additionné d'un sérum frais quelconque, récupère ses propriétés originelles.

Nous expliquerons brièvement ces faits. Le choléra-sérum frais contient deux substances : la *cytase*, non spécifique (ou alexine normale, que nous connaissons déjà) et la *philocytase* (ou *fixateur*), spécifique. Cette dernière résiste à 55°. Elle joue le rôle de sensibilisatrice (Bordet), se fixe sur les vibrions et permet ensuite la fixation de la cytase, qui peut alors accomplir sa fonction bactéricide. A propos des cytotoxines (dont les « bactério-toxines » ne sont qu'un cas particulier), nous entrerons dans plus de détails. Disons seulement que lorsque l'on chauffe le choléra-sérum à 55°, on détruit la cytase et on respecte la philocytase ; lorsqu'on additionne de sérum frais le choléra-sérum chauffé, on lui restitue la cytase enlevée (vis-à-vis de la philocytase du choléra-sérum, les cytases de divers animaux s'équivalent). Il est facile de démontrer la fixation de la philocytase par les vibrions, fixation qui a déjà lieu à 0°. On fait un mélange de vibrions et de choléra-sérum (chauffé à 55°) et on

centrifuge : le liquide clair, additionné de sérum normal frais (cytase), se montre inactif. La cytase est incapable de se fixer d'elle-même sur les vibrions, elle ne se fixe que par l'intermédiaire de la philocytase et encore faut-il une température un peu élevée.

Tandis que la philocytase, produit de la digestion des vibrions par les leucocytes, peut diffuser *in vivo*, la cytase, sécrétion endocellulaire normale des leucocytes, n'est mise en liberté que lors de la destruction des globules blancs (*phagolyse*). Ceci explique pourquoi le phénomène de Pfeiffer fait défaut toutes les fois que la phagolyse vient à manquer. On ne l'observe que lors de l'inoculation intrapéritonéale et, même dans ce cas, il se trouve supprimé si on a « préparé » l'animal par une injection intra-abdominale de bouillon, pratiquée la veille. Cette « préparation » a pour effet de renforcer les leucocytes et de prévenir la phagolyse.

MM. Bordet et Gengou ont démontré que *les microbes fixent les philocytases* (et, par leur intermédiaire, les cytases) même dans le cas d'immun-sérums non bactéricides (sérums d'animaux vaccinés contre le b. pesteux, le b. typhique, le premier vaccin charbonneux, le b. du rouget, le proteus vulgaris). Pour cela, ils mélangent une philocytase anti-microbienne (immun-sérum chauffé), une cytase (sérum normal frais) et une émulsion microbienne (microbe correspondant à la philocytase). Après un contact de 5 heures à la température ordinaire, il ajoutent une philocytase hémolytique (voir chapitre suivant) et des hématies correspondantes. Ces dernières, bien que fixant la philocytase hémolytique, ne sont pas dissoutes, parce qu'il ne reste plus de cytase libre dans le mélange. En effet, les microbes ont fixé

celle-ci, par l'intermédiaire de la philocytase anti-microbienne.

Propriétés agglutinantes.

Plusieurs sérums antimicrobiens agglutinent les organismes correspondants (vibrions, pneumocoque, b. du rouget, b. pyocyanique, b. typhique, coli-bacilles, b. aerogenes...).

Comme nous le verrons plus tard (sérodiagnotic de diverses maladies et notamment de la fièvre typhoïde), on peut réaliser de deux façons différentes le phénomène de l'agglutination : soit en mélangeant au sérum une émulsion microbienne, soit en additionnant de sérum le bouillon ensemencé. Dans le premier cas, le liquide trouble s'éclaircit et les microbes se réunissent à la partie inférieure du vase ; dans le second, la culture se développe suivant le type streptococcique. Certains organismes se laissent agglomérer à l'état naissant, mais point à l'état adulte, tel le pneumocoque. Plusieurs espèces sont agglutinables après leur mort.

L'activité du sérum varie beaucoup selon les circonstances ; parfois il existe un degré de dilution optimum (le sérum des animaux immunisés contre le rouget se comporte ainsi, d'après M. Mesnil). M. Salimbeni a établi que l'air favorise l'agglutination. Il a constaté aussi que l'agglutination manque *in vivo*. On ne l'observe pas, en effet, quand on injecte des vibrions à des animaux qui ont reçu du choléra-sérum la veille ; on l'observe, au contraire, chez les sujets qui reçoivent un mélange de sérum et de vibrions et elle s'accuse d'autant plus qu'on a attendu davantage, une fois le mélange fait, avant de pratiquer l'inoculation. La seule modification

qui se produise au sein de l'organisme vivant, c'est l'immobilisation des vibrions.

La substance agglutinante (ou *agglutinine*) représente, comme la philocytase, un produit de digestion leucocytaire, diffusible *in vivo*. Comme la philocytase également, elle résiste à 55° et se fixe sur les microbes. M. Bordet a montré que la composition saline du milieu joue un rôle essentiel dans le phénomène de l'agglomération. L'expérience suivante le prouve sans conteste. Une émulsion de vibrions, en eau physiologique, est traitée par le choléra-sérum : l'agglutination a lieu. On centrifuge, on décante et on fait deux portions. L'une (A) est additionnée d'eau physiologique, l'autre (B) d'eau distillée. On centrifuge : la précipitation est plus rapide pour (A) que pour (B). On recommence l'expérience avec les dépôts (A') et (B') : (A') montre une précipitation, (B') n'en montre pas ; mais, si on ajoute 0,75 pour 100 de sel, l'agglutination apparaît.

Les sérums antimicrobiens peuvent contenir des *coagulines*, distinctes des agglutinines et susceptibles de précipiter les cultures filtrées (Kraus, Ch. Nicolle) ; tel est le cas, par exemple, du typhus-sérum.

SÉRUMS ANTITOXIQUES

Ils sont *préventifs* vis-à-vis des toxines et des microbes. Ils sont également *antitoxiques*, c'est-à-dire qu'ils neutralisent les toxines par mélange. Enfin, ils sont *souvent curatifs* contre l'infection ou l'intoxication. Cette propriété curative n'est malheureusement pas toujours en rapport avec le pouvoir préventif, quelle que soi la dose employée ; le mode d'inoculation peut, dans certains cas, obvier à cet inconvénient (inoculation intracérébrale du sérum antitétanique — *ubi supra*).

Les antitoxines résistent à 55°, comme les philo-

cytases dont elles partagent la plupart des propriétés.

Les antitoxines ne détruisent pas les toxines *in vitro*, ainsi que l'ont démontré MM. Roux et Calmette pour le sérum antivenimeux et M. Wassermann pour le sérum antipyocyanique. En chauffant à 70° un mélange de venin et d'antivenin, les premiers ont détruit l'antitoxine sans modifier la toxine ; en chauffant à 100° un mélange de poison et de contrepoison pyocyaniques, le second a obtenu le même résultat.

Pour étudier la *formation des anticorps* (substances spécifiques des sérums antimicrobiens et antitoxiques), on tue par hémorragie les animaux hyperimmunisés et on émulsionne des poids connus des divers organes avec de l'eau physiologique. L'activité des extraits ainsi obtenus est comparée (après filtration) avec celle du sérum et, si l'on veut, avec celle des autres humeurs.

CHAPITRE V

ÉTUDE DES CYTOTOXINES

Généralités.

On devrait donner le nom de cytotoxines à tous les poisons cellulaires ou, tout au moins, aux poisons cellulaires qui présentent les caractères des toxines. L'usage le réserve aux *toxines d'origine animale, susceptibles d'agir sur les cellules animales.* Ces poisons spéciaux sont représentés jusqu'ici par les humeurs et, plus particulièrement, le sérum des animaux neufs (*cytotoxines naturelles*) ou des animaux traités (*cytotoxines artificielles*).

Le sérum des animaux neufs peut agir sur une seule sorte d'éléments cellulaires (sérums hémotoxiques, par exemple), mais d'ordinaire son action n'est pas limitée aux éléments d'une espèce animale unique. Il peut agir aussi sur divers éléments cellulaires et, le plus souvent alors, sur divers éléments de plusieurs animaux. Nous pouvons citer, comme exemple de ce dernier cas, l'action du sérum des murénides sur différentes cellules des mammifères.

Le sérum des animaux traités est, au contraire, strictement spécifique. Lorsqu'on injecte, sous la peau ou dans le péritoine d'un animal d'une espèce B, des cellules déterminées d'un animal d'une espèce A (il est souvent indiqué de choisir des espèces éloignées l'une de l'autre, telles qu'un mammifère et un oiseau — Delezenne), le sérum de l'animal de l'es-

pèce B deviendra toxique pour les mêmes cellules prises sur un sujet quelconque de l'espèce A.

Les sérums cytotoxiques sont, comme on le voit, complètement superposables aux sérums bactériotoxiques (bactéricides), tels que le choléra-sérum ; *c'est ce qui fait que l'étude des cytotoxines naturelles et artificielles, inaugurée par les bactériologues* (Belfanti et Carbone, Bordet — 1893), *restera longtemps encore leur apanage. Elle constitue d'ailleurs un schéma excellent et fort utile de l'action de l'organisme sur les microbes.* Aussi lui avons-nous donné quelques développements dans cet ouvrage.

Les sérums cytotoxiques peuvent modifier de trois façons différentes les cellules soumises à leur action (*in vitro*). Ils peuvent *immobiliser* les éléments mobiles (spermatozoïdes, épitheliums à cils vibratiles), *agglutiner* les cellules et les *dissoudre*. Le pouvoir agglutinant et le pouvoir dissolvant, bien que d'essence différente, coexistent souvent dans un même sérum (hémotoxines).

Les cellules sensibles, injectées dans le péritoine d'un sujet à sérum actif, peuvent présenter le *phénomène de Pfeiffer*. Le parallèle se poursuit, comme on le voit, avec les vibrions et le choléra-sérum, ainsi que l'a fait remarquer le premier M. Bordet.

Les cytotoxines, injectées aux animaux neufs, vont porter leur action sur les cellules sensibles. L'injection constitue même le seul moyen de mettre en évidence l'influence de quelques-unes d'entre elles (névrotoxines, néphrotoxines, par exemple). Notons dès maintenant que, vis-à-vis des cellules sensibles, les cytotoxines se montrent *à forte dose* des *agents de destruction* et *à faible dose* des *excitants*.

En dehors de l'*agglutinine*, les cytotoxines contiennent, comme les bactériotoxines, 2 substances différentes (Bordet) : la *cytase* et la *philocytase*, sur

lesquelles nous allons revenir, avec quelques détails.

La cytase de Metchnikoff (alexine de Buchner, complément d'Ehrlich, substance bactéricide de divers auteurs) n'est pas spécifique. Elle représente un produit normal des leucocytes et ne saurait être mise en liberté sans la destruction de ceux-ci. Elle disparaît par un chauffage d'une demi-heure à 55°.

La philocytase ou *fixateur* de Metchnikoff, (substance immunisante d'Ehrlich, sensibilisatrice de Bordet, substance préventive de divers auteurs) est, au contraire, spécifique. Elle représente un produit de la digestion leucocytaire et varie avec la nature de la cellule digérée. Elle est susceptible de passer, au moins partiellement, dans les humeurs, *in vivo*. Elle présente à la chaleur la même résistance (55°) que l'agglutinine spécifique; qui constitue elle aussi un produit leucocytaire diffusible chez le vivant.

La cytase ne peut exercer son action que si les cellules ont été sensibilisées par la philocytase, et encore faut-il une température suffisante. La philocytase se fixe déjà à 0°.

Un sérum cytotoxique frais contient donc de la cytase et de la philocytase. La première disparaît plus ou moins vite par le vieillissement. Nous avons vu qu'on pouvait la faire disparaître immédiatement par le chauffage. Le sérum chauffé reprend son activité quand on l'additionne de sérum neuf, c'est-à-dire quand on lui restitue de la cytase.

Les *cytotoxines naturelles contiennent,* elles aussi, de la *cytase,* de l'*agglutinine* et sans doute, dans certains cas, de la *philocytase.*

Les cytotoxines artificielles sont ordinairement des *hétérotoxines.* On peut aussi obtenir des *isotoxines* (hémotoxines) et des *autotoxines* (spermotoxines), suffisamment définies par leurs noms.

Les cytotoxines, naturelles ou artificielles, peuvent

engendrer des *anticorps*. Le sérum de l'animal B, injecté à un animal de l'espèce A (ou même d'une tierce espèce), provoque, en effet, chez ce dernier la formation d'un anticorps. Celui-ci contient toujours de l'*anticytase*, quelquefois de l'*antiphilocytase*, moins fréquemment de l'*anti-agglutinine*.

Hémotoxines.

1° Hémotoxines artificielles.

a) **Préparation du sérum hémotoxique.** — On peut traiter le cobaye par le sang défibriné de lapin (Bordet); le lapin par le sang de poule (Bordet); le cobaye par le sang d'oie (Metchnikoff); la chèvre par le sang d'agneau (Ehrlich et Morgenroth) etc... La technique suivante, indiquée par M. Cantacuzène, donne d'excellents résultats. On injecte, dans le péritoine d'un cobaye, 2 centimètres cubes de sang défibriné de lapin; 12 jours plus tard, 5 centimètres cubes; puis 10 centimètres cubes, après 12 autres jours; et 15 centimètres cubes, après 12 nouveaux jours. On saigne 15 jours plus tard.

b) **Action du sérum.** — *In vivo.* — Si on injecte, dans les veines d'un lapin, 15 centimètres cubes du sérum obtenu de la façon précédente, on tue l'animal en quelques minutes. A l'autopsie, on trouve le système sanguin rempli de caillots baignant dans un sérum coloré et il existe dans les viscères de nombreuses suffusions hémorragiques (Belfanti et Carbone, Bordet, Cantacuzène). Si on injecte, sous la peau d'un lapin, une dose forte, mais non mortelle (2-3 centimètres cubes), on observe une déglobulisation aiguë, suivie d'une réparation très lente. S'il s'agit d'une faible dose (1/25e de centimètre

cube), on provoque au contraire une stimulation de l'hématopoièse. Enfin, si on injecte des doses faibles, répétées et espacées, l'action stimulante est portée à son maximum. Il est impossible toutefois de l'exagérer au delà d'une certaine limite, mais elle se prolonge pendant quelques semaines après la dernière injection (Cantacuzène).

In vitro. — Le sérum obtenu par le procédé de Cantacuzène, que nous continuons à prendre pour type, agglutine au 1/50e et dissout au 1/2 ou au 1/3 (chiffres approximatifs, bien entendu). Le sérum, préparé en traitant les chèvres par le sang d'agneau, dissout mais n'agglutine pas (Ehrlich et Morgenroth). Notons encore que les sérums hémotoxiques (le sérum du cobaye traité par le sang d'oie, par exemple — Metchnikoff) ne dissolvent pas les noyaux des hématies des oiseaux.

c) **Action de l'organisme des animaux traités.** — Si on injecte 2 centimètres cubes de sang de lapin dans le péritoine d'un cobaye traité par les hématies de lapin et si on prélève un peu de lymphe péritonéale après 10 minutes, on voit que les hématies sont déjà complètement dissoutes (Bordet). Quand l'injection est faite sous la peau, il n'y a pas de destruction extracellulaire; les hématies sont phagocytées.

d) **Équivalence de diverses cytases, vis-à-vis de la philocytase.** — Le sérum du cobaye traité par les hématies du lapin, chauffé à 55° (pour détruire la cytase), reprend son action si on ajoute du sérum neuf de chèvre, de rat, de lapin (Bordet).

e) **Fixation de l'agglutinine et de la philocytase par les hématies.** — Si on mélange 1/2 centimètre cube de sérum actif de cobaye, chauffé à 55° et 3 centimètres cubes de sang de lapin, puis qu'on centrifuge, le liquide clair n'agglutine plus de nouvelles hématies de lapin. L'agglutinine a donc été fixée

par les hématies. On se rendra compte, de même, de la fixation de la philocytase, en mélangeant une partie de ce liquide clair, une partie de sang de lapin et 3 parties de sérum neuf de cobaye : on n'observe aucune dissolution (Bordet).

f) **Isotoxine.** — En traitant une chèvre par les hématies d'autres chèvres, on obtient un sérum qui agit sur les hématies des chèvres, à l'exception toutefois de celles de l'animal traité.

g) **Anticorps des hémotoxines artificielles.** — M. Bordet indique le mode de préparation suivant : on injecte à un lapin, à 2-3 reprises et à 15 jours d'intervalle, 2-3 centimètres cubes de sérum actif de cobaye. On saigne 12 à 15 jours après la dernière injection. Le sérum du lapin contient de l'antiagglutinine, de l'antiphilocytase et de l'anticytase. 10 à 20 parties de sérum neutralisent 1 partie de toxine.

L'étude des antihémotoxines est des plus complexes et entraîne fatalement à un grand nombre de considérations théoriques. Nous ne saurions entrer, pour cette raison, dans le détail des expériences auxquelles elle se prête.

2° Hémotoxines naturelles.

Elles sont très répandues. Ainsi, le sérum de la poule agglutine et dissout les hématies du lapin. De même, le sérum d'anguille agglutine et dissout les hématies du cobaye et du lapin. Injecté dans les veines du lapin, ce dernier sérum détermine de l'hémoglobinurie. Introduites en péritoine d'anguille, les hématies du cobaye et du lapin sont détruites rapidement. Inutile de multiplier les exemples.

Les sérums normaux renferment de l'*agglutinine*, de la *cytase* et sans doute, dans certains cas, de la *philocytase*, comme l'indiquent les expériences sui-

vantes (Ehrlich et Morgenroth). Le sérum de chien dissout les hématies du cobaye. Le chauffage à 55° supprime la propriété globulicide ; si on ajoute du sérum de cobaye neuf, les hématies se dissolvent à nouveau. Le sérum de chèvre dissout les hématies du lapin et du cobaye. Si on le chauffe à 55°, il cesse de donner lieu au phénomène, qui réapparaît par addition de sérum de cheval.

Les sérums, chauffés ou vieux, ne dissolvent plus, mais agglutinent encore. C'est ainsi que le sérum de grenouille, qui dissout les hématies du lapin, les agglutine mais ne les dissout plus lorsqu'il a été porté à 55°, ou simplement conservé pendant 24 heures (Krompecher).

L'agglutinine et la philocytase se fixent sur les hématies. MM. Ehrlich et Morgenroth laissent en contact pendant une demi-heure à 20° du sérum de chien (chauffé) et des hématies de cobaye. Ils centrifugent, lavent le dépôt à l'eau physiologique et ajoutent du sérum de cobaye neuf. Ils observent alors la dissolution des hématies. Une expérience analogue de M. Bordet, faite avec du sérum de poule chauffé et du sang de lapin, démontre la fixation de l'agglutinine.

Les hémotoxines naturelles peuvent engendrer des *anticorps*. Le sérum des lapins traités par le sang de poule protège (à un faible degré, il est vrai), les hématies des lapins neufs (Bordet). On peut également, en injectant du sérum d'anguille à un lapin, l'immuniser contre les effets de ce sérum (Tschistowitch).

Hémonucléotoxines (artificielles).

Il nous suffira de mentionner l'existence de ces toxines, démontrée par les expériences de M. Krompecher. Cet auteur injecte à un lapin des hématies

lavées de grenouille (le sérum de grenouille est très toxique). Le sérum du lapin agglutine et dissout les hématies de la grenouille. S'il est assez fort, il dissout aussi les *noyaux* de ces hématies.

Leucotoxines (artificielles)

Préparation du sérum. — M. Metchnikoff injecte, sous la peau des cobayes, une émulsion de rate de rats ; 47 jours plus tard, le sérum de ces cobayes a acquis la propriété d'agglutiner et de dissoudre les leucocytes des rats. Une autre méthode, due au même savant, consiste à injecter sous la peau des cobayes une émulsion de ganglions mésentériques de lapins. M. Besredka injecte sous la peau d'un cobaye la moitié d'un pancréas d'Aselli de lapin et il répète l'injection 8 jours après ; 15 jours plus tard, le sérum est devenu actif. Le même auteur conseille l'injection, sous la peau du cobaye, de moelle osseuse de lapin (on obtient ainsi un sérum très fort, mais, en même temps, très hémolytique) ou encore l'injection, sous la peau du lapin, de 2 à 3 ganglions mésentérique de cobaye. Ces dernières injections doivent être répétées au moins 3 fois, à 8 jours d'intervalle chacune. Il faut noter que les sérums obtenus se montrent constamment très fragiles.

Action du sérum. — *a*) *In vivo* (Besredka). — Quand on injecte au lapin du sérum actif de cobaye, dans les veines ou sous la peau, il y a toujours, quelle que soit la dose employée, une longue période d'incubation (6 à 8 jours environ). L'injection, sous la peau, d'une dose forte mais non mortelle (5 centimètres cubes), amène de l'hyperleucocytose pendant plusieurs jours. Une dose forte (3 centimètres cubes) de sérum actif de lapin, injectée dans le péritoine du cobaye, tue en 3 ou 4 heures. La

diarrhée est fréquente, le ventre se ballonne et l'on constate de l'hypothermie. A l'autopsie, on trouve les viscères congestionnés et l'exsudat abdominal pauvre en leucocytes. Si on injecte une dose forte, mais non mortelle, l'animal reste malade pendant quelques heures, et se rétablit ensuite. Pendant 3 jours, l'exsudat péritonéal est pauvre en leucocytes, puis il se produit de l'hyperleucocytose (avec prédominance des mononucléaires). Les injections répétées donnent toujours de la leucocytose. Il y a là un bon moyen de produire celle-ci, moyen particulièrement précieux lorsque c'est la mononucléose qu'on désire obtenir.

b) *In vitro*. — Si on examine au microscope un mélange de sérum de cobaye, traité par l'émulsion splénique de rats — et de leucocytes de rats, provenant d'un exsudat péritonéal, on voit que les mononucléaires sont altérés les premiers et transformés en vésicules claires à noyau visible ; les polynucléaires dégénèrent ensuite ; les Mastzellen résistent un peu plus longtemps. Le sérum de cobaye, traité par l'injection de ganglions mésentériques de lapin, est actif, lui aussi, contre les deux espèces de leucocytes du lapin (Metchnikoff). De même encore, le sérum du cobaye, auquel on a injecté du pancréas d'Aselli de lapin, dissout les leucocytes du lapin, dans la proportion d'une partie de sérum pour 20 de lymphe péritonéale (Besredka). Signalons enfin une curieuse propriété des sérums antileucocytaires, découverte par M. Delezenne ; à l'instar des protéoses, ils favorisent la coagulation du sang de chien *in vitro* et l'empêchent *in vivo*.

Anticorps des leucotoxines artificielles. — Ils sont encore mal connus. Après 2 ou 3 injections de sérum de lapin actif, le sérum des cobayes acquiert des propriétés antitoxiques. Cependant, le cobaye qui fournit le sérum réagit encore à la leucotoxine.

Hématotoxines (artificielles).

Nous appelons ainsi les *toxines combinées des hématies et des leucocytes*. On les obtient par injection de sang total et on les a préparées surtout dans un but leucotoxique. MM. Metchnikoff et Besredka injectent du sang humain à la chèvre. Le sérum de l'animal agglutine et dissout les hématies de l'homme. Injecté à l'homme, ce sérum constitue un excitant de l'hématopoièse et de la leucopoièse. Il a été employé à ce titre chez les lépreux et les résultats qu'il a fournis ont même été assez satisfaisants.

Spermotoxines (artificielles).

Préparation du sérum. — M. Landsteiner injecte au lapin des spermatozoïdes de taureau ; Moxter injecte au lapin des spermatozoïdes de bélier ; M. Metchnikoff inocule des spermatozoïdes d'homme ou de taureau dans le péritoine du cobaye, ou des spermatozoïdes de lapin sous la peau du cobaye. M. Métalnikoff broie, dans de l'eau physiologique, des testicules et des épididymes de cobaye ; il les passe sur une toile métallique et les inocule sous la peau des lapins ; il pratique deux à trois injections à 5 jours d'intervalle et le sérum devient alors suffisamment actif.

Action du sérum. — Il jouit de la propriété d'immobiliser les spermatozoïdes correspondants. Nous devons faire remarquer cependant que le sérum frais, préparé par M. Métalnikoff, n'agit guère mieux que le sérum de lapin neuf. Cela tient à ce que ce dernier contient une spermotoxine naturelle. Chauffé et réactivé par le sérum (absolument inoffensif) du cobaye neuf, le sérum de Métalnikoff se montre très actif.

Autospermotoxine. — Le sérum d'un cobaye, inoculé sous la peau ou dans le péritoine avec les spermatozoïdes d'un autre cobaye, devient spermotoxique pour les spermatozoïdes des autres cobayes et pour les siens. Ce sérum contient de la cytase et de la philocytase. Celle-ci circule dans les humeurs de l'animal traité et sensibilise ses spermatozoïdes sans les dissoudre, puisqu'*in vivo* la cytase demeure confinée dans les leucocytes. La réalité de cette action sensibilisatrice est prouvée par le fait que les spermatozoïdes du cobaye traité meurent en quelques minutes dans le sérum neuf de cobaye, tandis que les spermatozoïdes des cobayes non traités sont susceptibles d'y vivre quelques heures,

Injectés dans le péritoine d'un cobaye traité, les spermatozoïdes de cobaye meurent rapidement (*phagolyse*), tandis que dans le péritoine d'un cobaye neuf, ils vivent 1 à 2 heures. Ils vivent une heure au moins, puis sont phagocytés dans le péritoine d'un cobaye traité, mais « préparé » la veille (ici la phagolyse fait défaut). Enfin, sous la peau d'un cobaye traité, ils vivent au moins 2 heures et sont phagocytés plus lentement encore (Métalnikoff).

Antispermotoxine. — M. Metchnikoff obtient une antispermotoxine, en pratiquant chez les lapins (en 5 à 19 jours) 3 ou 4 injections de 2,5 à 7 centimètres cubes de sérum spermotoxique de cobaye. Le sérum obtenu est peu actif ; il en faut de 1 à 8 parties pour neutraliser l'effet d'une partie de toxine. Constatation fort intéressante au point de vue de la formation des antitoxines, M. Metchnikoff a montré que les lapins châtrés et les lapines fournissent un sérum tout aussi bon que les lapins entiers. Il a fait voir également qu'une tierce espèce, le rat, peut donner un sérum antitoxique préservant les spermatozoïdes du lapin contre le sérum

spermotoxique du cobaye. M. Métalnikoff, en inoculant aux cobayes le sérum spermo-toxique du lapin, a produit une antitoxine peu active et uniquement composée d'anticytase.

Névrotoxines (artificielles).

Préparation du sérum. — Le meilleur mode de préparation est celui qu'a indiqué M. Delezenne. Il consiste à injecter des émulsions de centres nerveux de chien dans le péritoine du canard. On pratique 5-6 inoculations en deux mois. On commence par 8 à 10 grammes d'émulsion et on va jusqu'à 20 et au delà. Quelques animaux meurent au cours du traitement. Les survivants sont saignés 8 à 10 jours après la dernière injection.

Action du sérum. — $0^{cc},5$ à $0^{cc},6$, injectés dans le cerveau d'un chien adulte, le tuent rapidement ; quand la mort n'est pas foudroyante, on assiste à une paralysie progressive. $0^{cc},1$ à $0^{cc},2$ donnent des phénomènes d'excitation, suivis de paralysie (plus la dose est faible, plus la période d'excitation est développée) ; la mort se montre constante. Les jeunes chiens résistent plus que les adultes ; ils survivent en général à l'inoculation intracérébrale de 0,4 à 0,5.

Néphrotoxines (artificielles).

Préparation du sérum. — M. Lindemann injecte au cobaye des émulsions de rein de lapin. M. Nefedieff a noté qu'au cours des manipulations une asepsie parfait eétait indispensable. Aussi a-t-il fait construire par Collin une petite presse spéciale, destinée à broyer le tissu rénal. Il injecte, sous la peau du lapin, 2-5 centimètres cubes d'émulsion de rein de cobaye (ce qui représente 1 ou 2 reins) et renouvelle

ensuite 3 ou 4 fois les inoculations. Le même auteur injecte également au cobaye, à 3 reprises, le quart d'un rein de lapin, il laisse 8-10 jours d'intervalle entre chaque inoculation et saigne 8 à 10 jours après la dernière injection.

Action du sérum. — D'une façon générale, les sérums néphrotoxiques sont très peu actifs. D'après M. Lindemann, $1^{cc},25$ à $2^{cc},6$ donnent de l'albuminurie au lapin lorsqu'ils sont injectés sous la peau; inoculés dans les veines, ils peuvent amener la mort. Pour M. Nefedieff, le sérum des lapins traités tue le cobaye en quelques jours, si l'on emploie une forte dose (10 centimètres cubes environ); l'albuminurie est constante, mais très peu considérable.

Surrénotoxines (artificielles)

Préparation du sérum. — MM. Bigart et Bernard tuent des cobayes par hémorragie et broient, avec du sable, 10 à 12 capsules surrénales, en ajoutant la quantité nécessaire d'eau physiologique. Ils laissent reposer l'émulsion et injectent dans le péritoine d'un canard le liquide qui surnage. Ils recommencent après 8 jours, puis après 15, et saignent 3 semaines plus tard.

Action du sérum. — Le sérum, ainsi obtenu, tue 125 fois son poids de cobaye. Suivant la dose injectée, la mort survient en quelques heures ou en une dizaine de jours. Les phénomènes observés pendant la vie sont l'anorexie, l'émaciation, parfois un certain degré de paresse motrice. A l'autopsie, les capsules surrénales se montrent hypertrophiées.

Trichotoxines (artificielles)

Le sérum des cobayes, auxquels on inocule par

la voie abdominale les cellules vibratiles de la trachée du bœuf, devient cellulicide à l'égard de ces éléments. Si on introduit les épithéliums dans le péritoine d'un cobaye traité, la destruction est encore plus brutale qu'*in vitro* (von Dungern).

Hépatotoxines (artificielles).

Les hépatotoxines ont fait l'objet de deux mémoires intéressants, l'un de M. Delezenne, l'autre de M. Deutsch. Le premier de ces auteurs injecte dans le péritoine du lapin, ou mieux du canard, une émulsion de foie de chien. Le second s'adresse au lapin et lui inocule par la voie abdominale des émulsions de foie de cobaye bien lavé. Injecté à dose suffisante sous la peau du chien, le sérum obtenu par M. Delezenne tue l'animal en 15 à 20 heures, avec dégénérescence graisseuse des cellules hépatiques.

M. Deutsch a remarqué qu'*in vitro* son sérum gonflait les cellules hépatiques du cobaye et les rendait transparentes. Injecté dans le péritoine du cobaye, ce sérum détermine une nécrose des parties superficielles du foie. Il agglutine enfin les grains de protoplasma hépatique émulsionné. Ajoutons que M. Delezenne a pu obtenir un *anticorps*.

Nous ferons remarquer, en terminant, qu'il peut être intéressant d'étudier la participation respective des divers organes et humeurs à la *formation des cytotoxines et des anticorps*. On y arrive en tuant les animaux par hémorragie et en faisant, avec des poids déterminés des différents viscères, des émulsions en eau physiologique. On filtre ces émulsions sur papier et on les compare, soit entre elles, soit avec le sérum ou les humeurs du même animal, au point de vue de leur action toxique ou antitoxique.

Nous ne pouvons aborder ici l'étude des *coagulines* et des *anticoagulines* artificielles, non plus que l'étude des *antidiastases*; ce serait s'éloigner par trop du but de cet ouvrage.

TROISIÈME PARTIE

APPLICATIONS MÉDICALES ET VÉTÉRINAIRES

Nous étudierons, tour à tour, les maladies infectieuses communes à l'homme et aux animaux — les maladies propres à l'homme — et les maladies propres aux animaux, en nous plaçant toujours à un point de vue essentiellement *pratique* et *technique*.

Notre classification en trois groupes paraîtra, nous le savons, parfois un peu arbitraire. Nous nous y sommes cependant tenus, à cause de sa commodité.

MALADIES COMMUNES A L'HOMME ET AUX ANIMAUX

CHARBON

I. *Principaux caractères de la bactéridie charbonneuse.*

Caractères morphologiques.

Dans le sang des animaux, examiné à l'état frais, la bactéridie du charbon se présente sous forme de bâtonnets droits, flexibles, immobiles, transparents, formés quelquefois de 2 à 3 articles, rarement davantage. La longueur est de 5 à 20 μ, l'épaisseur de 1 à 1,25 μ. Dans le liquide d'œdème, les microbes sont d'ordinaire peu nombreux, mais plus allongés. Dans la pulpe splénique, ils existent en quantité vraiment inouïe et constituent souvent un véritable feutrage. Sur les milieux solides, on trouve des bacilles courts; dans les liquides, au contraire, l'état filamenteux est de règle; les filaments, homogènes en apparence, sont en réalité formés d'articles cubiques, de longueur sensiblement égale. Les bacilles charbonneux présentent assez rapidement des spores endogènes, formant dans leur intérieur des points brillants, arrondis ou ovalaires. La production des spores n'amène aucune tuméfaction des bactéries. Si, à l'exemple de

M. Koch, on ensemence, en goutte suspendue, de la pulpe de rate de souris infectée dans de l'humeur aqueuse de bœuf, *à une température supérieure à 15°*, on voit les bacilles s'allonger déjà après 2 heures. Après 3 ou 4 heures, ils sont 10 à 20 fois plus longs, s'infléchissent et se contournent. Le contenu des filaments ainsi formés devient ensuite granuleux et les spores apparaissent après un temps variable, d'autant plus long que la température est plus basse. Le reste de la bactéridie ne tarde pas à se résorber et les germes, devenus libres, s'amassent finalement à la partie inférieure de la goutte suspendue. Ensemencés à nouveau dans de l'humeur aqueuse, ils vont germer et donner naissance à de nouveaux bacilles ; et ainsi de suite. Avant de sporuler, la bactéridie se reproduit par scission ; ce mode de multiplication est le seul qu'on observe dans le corps des animaux. Le b. anthracis se colore bien par toutes les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram. Les spores ne sont pas justiciables des colorations ordinaires ; la méthode de Möller réussit très bien à les mettre en évidence.

Caractères de culture.

Dans le bouillon, la bactéridie forme en 24 heures des flocons qui ne troublent pas le liquide et se déposent au fond du tube. Après quelques jours, le milieu brunit légèrement et les flocons sont remplacés par une fine poussière (spores). Si, au moyen de l'appareil Hermann, on soumet pendant plusieurs jours la culture à l'agitation continue, elle devient très visqueuse (Malvoz). Il s'en faut de beaucoup que le b. anthracis fournisse constamment l'aspect classique en bouillon ; souvent, en effet, on n'observe qu'un trouble uniforme. C'est affaire de microbe et

de milieu. Pour obtenir à coup sûr la culture type, l'un de nous conseille, dans son cours, les précautions suivantes : ensemencer avec des spores ; dans du bouillon sans peptone étendu au tiers avec de l'eau physiologique ; et placer les tubes à 22°.

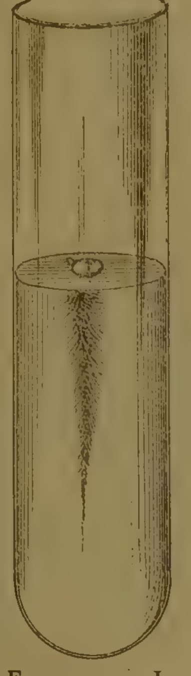


Fig. 117. — Jeune culture charbonneuse en gelatine.

En gélatine par piqûre, le microbe se développe surtout dans les couches superficielles, sous forme d'une traînée continue, émettant latéralement des prolongements ramifiés (fig. 117). L'aspect a été comparé à celui d'un sapin renversé ; la gélatine se liquéfie lentement. En plaques, on observe d'abord des taches grisâtres d'apparence mycoïde ; puis les colonies descendent peu à peu dans des godets de liquéfaction. Sur gélose, il se forme une traînée blanche, crémeuse, émettant elle aussi des prolongements, que l'on a comparés aux barbes d'une plume. Sur pomme de terre, c'est une couche visqueuse d'un gris sale. Le sérum coagulé se liquéfie lentement. Le lait se coagule du troisième au cinquième jour et le caillot se redissout du septième au dixième. La bactérie se cultive également dans le sang, qui devient noir.

Caractères biologiques.

Le b. anthracis est essentiellement aérobie. Il n'aime pas les milieux acides. Il digère la gélatine, le sérum, la caséine. Il saccharifie l'amidon, puis donne des acides, principalement de l'acide acétique. Il fournit aussi des acides avec le glycogène. Pour

Mlle Napias, la bactéridie charbonneuse produit, aux dépens des matières amylacées et des sucres, un acide fixe (acide lactique) et un acide volatil (acide acétique). Quand l'aliment devient rare ou est difficile à attaquer (amidon), elle consomme ensuite l'acide lactique et le transforme en acide acétique qui est finalement brûlé.

Le b. anthracis ne se développe ni au-dessous de 12° ni au-dessus de 45°. Il ne donne de spores ni au-dessous de 15° (Koch) ni au-dessus de 42° (Pasteur). A 16°, les spores se forment en 7 jours; elles apparaissent en 20 heures à 35° (température optima). Elles ne naissent pas à l'abri de l'oxygène. M. Schreiber a montré, contrairement à l'opinion courante, que toutes les substances qui favorisent le développement de la bactéridie favorisent aussi la formation des spores. Pour M. Buchner l'acidité nuit à cette formation ; pour M. Schreiber une acidité légère est favorable tandis qu'une certaine alcalinité se montre défavorable. Nous avons étudié déjà, dans une autre partie de cet ouvrage, la production de races asporogènes ; inutile d'y revenir.

Caractères d'inoculation.

Chez la souris, le cobaye et le lapin, l'inoculation sous-cutanée détermine, après 10 ou 15 heures, de l'œdème et une élévation thermique de 1° à 2° ; aucun autre symptôme tout d'abord. C'est seulement quelques heures avant la mort qu'apparaissent de l'inquiétude, de la dyspnée et des mictions fréquentes. L'animal entre bientôt dans le coma, il se manifeste des convulsions légères et la température centrale s'abaisse à 34°, parfois même à 30°. A l'autopsie, on constate un œdème gélatineux, tremblotant, à peine rosé, renfermant peu de microbes et peu de leucocytes.

Les ganglions correspondants sont hypertrophiés, rouges, ecchymosés, entourés d'une zone étendue d'œdème où les bacilles se montrent très abondants. La rate est volumineuse, friable et molle. Les viscères sont congestionnés et, dans la vessie, on trouve (constamment chez le cobaye) une urine sanglante. Le sang du cœur est noir, mal coagulé, poisseux et ne rougit plus à l'air. Au microscope, on voit que les bactéridies ont envahi l'organisme (fig. 118 et 119); les organes les plus riches en

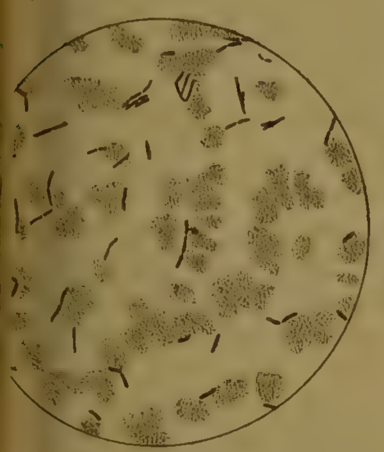


Fig. 118. — Sang de cobaye mort du charbon.

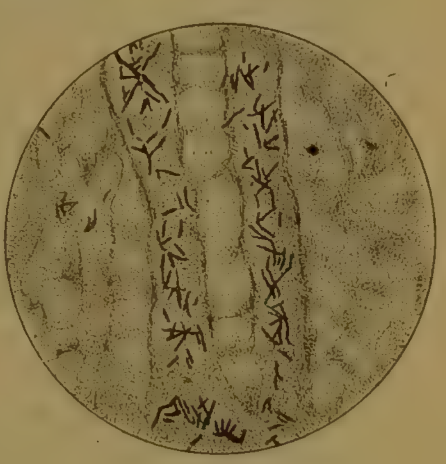


Fig. 119. — Mésentère de cobaye mort du charbon.

microbes sont la rate et le foie; les moins riches la peau, le cerveau, les muscles, le myocarde. Le b. anthracis se rencontre presque toujours dans l'urine, quelquefois dans la bile. La mort survient en 36 ou 40 heures chez le cobaye et la souris; en 48 ou 60 heures chez le lapin. Le cobaye et la souris sont facilement tués par inhalation.

Le mouton prend facilement le charbon par inoculation sous-cutanée et par inhalation. On le tue par ingestion, surtout si on mêle des corps piquants à sa nourriture (Pasteur). Les moutons algériens

sont, on le sait, infiniment moins sensibles que les moutons français. La chèvre présente à peu près la même réceptivité que le mouton.

Le bœuf peut être tué par ingestion et par inoculation intra veineuse. Il est très résistant à l'injection sous-cutanée. On observe chez lui des œdèmes énormes, avec engorgement ganglionnaire considérable et fièvre intense ; puis les tumeurs se résorbent et la guérison survient.

Le cheval et l'âne sont plus sensibles que le bœuf à l'inoculation sous-cutanée. Ils meurent en 3 à 5 jours. On trouve des ruptures vasculaires dans la plupart des tissus ; en beaucoup de points et principalement autour des ganglions, on observe des œdèmes assez volumineux.

Le chien se montre très résistant ; on arrive néanmoins à tuer régulièrement les animaux jeunes, par voie intra veineuse ou intra pleurale et fréquemment les animaux adultes, en usant de divers artifices. Le chat et le porc succombent également quand ils sont jeunes.

La poule est réfractaire. On peut cependant vaincre son immunité, en plongeant le tiers inférieur de son corps dans de l'eau à 25° (Pasteur), ou en lui injectant de l'antipyrine (Wagner).

Le pigeon n'est pas absolument réfractaire ; on le tue assez facilement dans la chambre antérieure. Un virus, exalté par quelques passages, le fait périr, si on l'inocule dans le grand pectoral.

MM. Löffler et Straus ont montré que le rat blanc n'était pas réfractaire au charbon, comme l'avait soutenu M. Behring. M. Metchnikoff, en commençant par de jeunes rats, a obtenu de son côté un virus qui tue finalement les rats adultes.

II. *Diagnostic bactériologique du charbon.*

A. **Chez les animaux.** — On a rarement l'occasion de faire le diagnostic *sur le vivant; sur le cadavre,* on pratiquera l'autopsie le plus rapidement possible après la mort. Les lésions sont absolument caractéristiques. Elles se montrent les mêmes dans presque toutes les espèces. Le sang est dissous, noir, poisseux; les organes congestionnés et ecchymosés; les ganglions ramollis, volumineux, friables. La muqueuse gastrique est épaissie; on trouve fréquemment des foyers hémorragiques dans l'intestin (charbons internes). La rate est hypertrophiée et diffluente, l'urine souvent sanglante. Les muscles ont une teinte saumonée. On rencontre des exsudats rosés dans les séreuses et les divers mucus sont sanguinolents. On constate enfin la présence de tumeurs: les unes, internes, fréquentes (paquets ganglionnaires, noyés dans des œdèmes et gorgés de sang noir), les autres, externes, plus rares (œdèmes gélatineux et tremblotants). L'examen microscopique du sang et de la pulpe des viscères, même sans coloration et à 400-500 diamètres, permet de reconnaître les bactéridies. Au besoin, on fera des cultures (plaques de gélatine) et des inoculations (cobaye, lapin, mouton). *Si le cadavre es déjà altéré,* il faut se méfier des divers microbes intestinaux, surtout du vibrion septique (voir ce chapitre). On recueillera le virus au sein des viscères, ou, mieux encore, dans un ganglion éloigné de l'abdomen. On inoculera de préférence le lapin dans les veines, le cobaye et le mouton par scarifications, pour tâcher d'éviter les septicémies accidentelles. Parfois, le virus impur ne tue pas les animaux; d'où la nécessité de faire toujours des cultures. Dans certains cas, c'est au sein des *viandes suspectes* qu'on devra rechercher le b. anth-

racis ; si les quartiers sont assez volumineux, on tâchera, encore ici, de découvrir un ganglion lymphatique ; sinon, on s'adressera au sang et au tissu conjonctif interfasciculaire (souvent œdématié). On pratiquera l'examen habituel ; nous conseillons aussi de faire des coupes microscopiques, qui pourront être précieuses en cas de contestation.

B. **Chez l'homme.** — La *pustule maligne* est la seule affection charbonneuse de l'homme, justiciable d'un diagnostic bactériologique pendant la vie. Les cas où l'infection se fait par la muqueuse digestive (charbon intestinal) ou par l'appareil respiratoire (maladie des trieurs de laine) demeurent très rares et les recherches ne seront guère pratiquées qu'à l'autopsie. La pustule maligne se prête très facilement à l'examen et on réussit souvent à mettre en évidence la bactéridie, surtout si la lésion est récente et n'a pas encore été traitée. C'est ordinairement au moment où l'escarre centrale s'est formée, c'est-à-dire lorsque la pustule a revêtu l'aspect caractéristique, que l'on est consulté pour le diagnostic. Le procédé le plus commode consiste, après avoir aseptisé la région, à faire quelques légères scarifications à la périphérie de la lésion, dans la zone érythémateuse. Le sang qui sort peut être étalé sur lames et ensemencé dans les milieux de culture habituels. Au sein de l'escarre centrale, par contre, les bactéridies se trouvent mélangées à d'autres organismes. — Le *passage* du microbe *dans le sang* indiquera que la période de généralisation est arrivée et constituera par là même un signe fatal ; dès qu'il est constaté, la mort est proche. — *A l'autopsie,* l'attention sera attirée sur la possibilité d'un *charbon intestinal,* par l'existence de saillies d'aspect furonculeux, pustuleux ou hémorragique, à sommet ulcéré, jaunâtre, gangreneux. Il existe un œdème gélatineux et hémorragique du tissu rétropéritonéal,

les ganglions mésentériques sont tuméfiés et ecchymotiques, la rate peu ou pas hypertrophiée. Le *charbon pulmonaire* se traduit par un épanchement abondant dans les plèvres, une infiltration gélatineuse du médiastin et du tissu sous-pleural ; les ganglions bronchiques sont très augmentés de volume ; enfin, on trouve des hémorragies dans le poumon et sur la muqueuse bronchique. L'étude bactériologique devra porter, comme toujours, de préférence sur les ganglions ; la pulpe sera examinée au microscope et servira à faire des inoculations et des ensemencements.

Nous ferons remarquer que, pas plus chez les animaux que chez l'homme, la *réaction agglutinante* ne saurait être utilisée pour le diagnostic du charbon. Le sérum de presque tous les animaux agglutine à l'état normal la bactéridie. Le sérum de l'homme sain agglutine habituellement au titre de 1/40 ; par contre, dans une observation de M. Viannay, le sérum d'un malade atteint de pustule maligne n'agglutinait pas du tout.

Nous rappellerons, en terminant, que les injections interstitielles d'acide phénique à 5 pour 100 constituent le meilleur *traitement de la pustule maligne*. L'un de nous a eu l'occasion d'employer à diverses reprises cette médication, qui lui a toujours donné d'excellents résultats, même dans plusieurs cas de pustules des lèvres qui s'accompagnaient d'un œdème volumineux et de tuméfaction des ganglions sous-maxillaires.

III. *Vaccination charbonneuse.*

On vaccine de préférence au printemps. Les deux vaccins sont inoculés à 12 ou 15 jours d'intervalle, à raison, chaque fois, de 1/8 de centimètre cube pour

le mouton et la chèvre et de 1/4 de centimètre cube pour les bovidés et les solipèdes. Les petits ruminants reçoivent les injections à la face interne de la cuisse, les bœufs en arrière de l'épaule, les chevaux à l'encolure. On ne recommence la vaccination, l'an suivant, chez les mêmes sujets que s'il s'agit de territoires très infectés ou d'animaux reproducteurs.

Ici (comme pour la vaccination du rouget) il faut suivre *certaines règles*, que nous rappellerons brièvement : 1° bien fractionner les doses, à l'aide du curseur, mobile sur la tige de la seringue de Pravaz ; 2° agiter le tube qui contient le vaccin, avant de le puiser ; 3° éviter de se servir d'un virus souillé, et pour cela utiliser chaque tube, une fois ouvert, dans la même journée et ne pas contaminer l'aiguille de la seringue avec toute espèce d'impuretés ; 4° veiller aux trois causes d'erreur suivantes : certains animaux s'échappent et se mêlent aux vaccinés, avant d'avoir été inoculés — lors de la piqûre, l'aiguille de la seringue peut traverser la peau et le liquide est projeté au dehors — la seringue peut contenir une bulle d'air que l'on injecte en place de vaccin (Chamberland).

Les tubes, fournis par l'Institut Pasteur, seront utilisés le plus tôt possible et on les conservera dans un endroit frais jusqu'au moment de leur emploi. Les seringues, fournies en même temps, sont toujours neuves ; on les fera remettre à neuf après la vaccination. On peut aussi les remettre à neuf soi-même, en remplaçant les pistons et les rondelles de cuir et en faisant bouillir le reste de l'appareil.

AFFECTIONS DUES AU VIBRION SEPTIQUE

Le vibrion septique de Pasteur se rencontre dans la terre (surtout la terre cultivée), dans les eaux (surtout les eaux boueuses), dans les poussières et dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Il envahit fréquemment les organes après la mort (principalement chez les animaux). Enfin, il produit, chez l'homme et les animaux, diverses septicémies gangreneuses.

Principaux caractères du vibrion septique.

Caractères morphologiques.

Le vibrion septique se présente sous des aspects un peu différents, selon les milieux où il s'est développé. Dans le liquide des phlyctènes de la gangrène gazeuse, ce sont des bacilles courts et trapus, pourvus ou non d'une spore et très mobiles ; dans la sérosité musculaire, il s'y joint des formes plus longues. A la surface des anses intestinales et du foie, on ne rencontre que de longs



Fig. 120. — Vibrion septique dans un frottis de la surface du foie, d'après Besson.

filaments flexueux, formés d'articles inégaux et pouvant occuper tout le champ du microscope (fig. 120). Ces filaments rampent, pour ainsi dire, écartant les cellules par un mouvement ondulant, que Pasteur a comparé au glissement d'un serpent dans les herbes. Enfin, dans les cultures, on rencontre à la fois des formes courtes et longues, qui ne tardent pas à donner naissance à des spores (fig. 121.) Celles-ci s'observent surtout dans les formes courtes ; elles siègent tantôt à l'extrémité du bâtonnet, tantôt à la partie moyenne ; elles produisent un renflement local et apparaissent comme un point brillant. Examinés en goutte suspendue, les bacilles qui se trouvent à la périphérie de la goutte demeurent immobiles, mais ceux des parties centrales se meuvent très nettement. Les formes courtes sont les plus agiles ; les formes longues présentent le mouvement serpentin décrit par Pasteur. La mobilité est fonction de cils vibratiles nombreux et pour la plupart très longs. Le microbe se colore avec toutes les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram ; la spore reste incolore dans ces conditions.



Fig. 121. — Vibrion septique (formation des spores en culture liquide).

Caractères de culture.

Dans le bouillon à l'abri de l'oxygène, la culture est abondante ; le liquide se trouble et offre une odeur

spéciale. En bouillon Martin, le développement se montre encore plus rapide; après 12 heures, la croissance est déjà très avancée et de nombreuses bulles de gaz apparaissent; vers le 3e ou le 4e jour, la culture s'éclaircit. Le vibrion septique se développe également bien en sérum liquide et sur sérum coagulé; ce dernier est rapidement liquéfié. Sur plaques de gélatine, il forme des taches blanches nuageuses, dont l'aspect est assez caractéristique au microscope (fig. 122); la liquéfaction

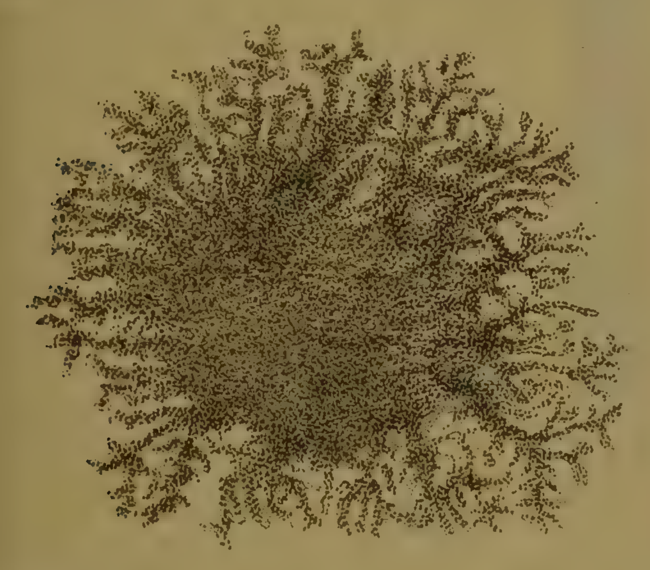


Fig. 122. — Aspect du vibrion septique sur plaques de gélatine (faible grossissement).

ne tarde pas à avoir lieu. En piqûre dans la gélatine, apparaissent, de même, des sphères nuageuses, autour desquelles se manifeste un dégagement gazeux (fig. 123); la liquéfaction est rapide. Sur plaques de gélose, ce sont des taches blanches, très petites, présentant à leur périphérie des arborescences délicates. Par piqûre dans la gélose, on observe une traînée blanche, festonnée sur les bords et le milieu se trouve disloqué par

une abondante production de gaz. Sur pomme de terre, la culture est peu marquée, incolore, à peine apparente. Le lait se coagule en petits flocons.

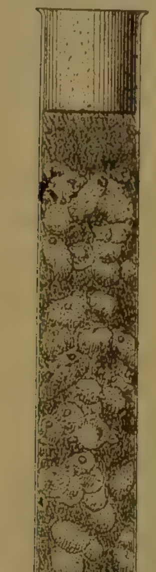


Fig. 123. — Culture du vibrion septique en gélatine.

Caractères biologiques.

Le vibrion septique est strictement anaérobie. Il se développe toutefois, plus ou moins, en présence de l'air, s'il est ensemencé avec le b. prodigiosus, le b. acidi lactici ou le proteus. Il dégage H, CO^2 et Az. Le glucose favorise la croissance et augmente beaucoup le dégagement gazeux ; il y a en même temps production d'acides. L'organisme de Pasteur engendre des phénomènes de réduction ; une coloration noire apparaît en effet, le long de la piqûre, dans les cultures en gélatine, additionnées de 3 pour 100 de tartrate de fer ; une coloration bleue, dans les cultures additionnées de nitro-prussiate de soude. Les vibrions ne forment guère de spores *in vivo* ; mais celles-ci apparaissent rapidement après la mort, surtout si le cadavre se trouve exposé à une température un peu élevée. Les vibrions non sporulés périssent facilement au contact de l'air. Les spores sont, au contraire, très résistantes ; à l'état humide, elles supportent pendant plusieurs heures une température de 80° et survivent plus d'une demi-heure à 90° (Besson). L'emploi des antiseptiques à chaud est nécessaire pour les détruire. La virulence se conserve longtemps dans les cultures et les humeurs.

Caractères d'inoculation.

Le cobaye représente l'animal de choix. 1/10e de centimètre cube de sérosité péritonéale virulente suffit pour le tuer, sous la peau ou dans les muscles (Davaine). Les signes de l'infection se manifestent très rapidement; le poil se hérisse, l'animal ne mange plus et pousse de petits cris, surtout lorsqu'on veut le saisir. Bientôt apparaissent des secousses et des convulsions du train postérieur. On note, localement, un œdème envahissant qui s'accompagne de crépitation au niveau de l'aine et de l'aisselle. La mort survient au bout de 8 à 15 heures. Quand on ouvre le cadavre, on sent une odeur aigrelette spéciale et on constate que l'œdème local a gagné les muscles, qui sont infiltrés d'une sérosité rosée. Le tissu cellulaire de l'aine et de l'aisselle est œdématié et rempli de gaz. Les intestins sont congestionnés ; le péritoine renferme un peu de liquide rosé; le foie présente une surface livide et comme lavée; la rate n'est pas augmentée de volume. Notons aussi que les poils s'arrachent avec une très grande facilité. L'inoculation, à fortes doses, dans les veines, tue avec des lésions généralisées des séreuses.

La souris est aussi réceptive que le cobaye ; le lapin plus résistant, mais il meurt cependant. Le rat blanc se montre assez sensible. Il faut, pour tuer le rat d'égout, une forte dose d'un virus actif ; l'animal succombe alors avec un énorme abcès local. Les solipèdes sont très réceptifs, l'âne plus encore que le cheval. Le mouton et la chèvre se montrent très sensibles également; 48 heures après l'infection sous-cutanée, une tuméfaction apparaît au point d'inoculation et des phénomènes graves se manifestent. La tumeur s'étend, devient crépitante, se recouvre de phlyctènes et la mort arrive

bientôt. L'injection intraveineuse donne l'immunité. Le porc, le chien, le chat, la poule, le canard, le pigeon sont réceptifs, bien qu'à un moindre degré. Les bovidés adultes sont réfractaires ; les bovidés jeunes présentent, en général, une tuméfaction volumineuse au point d'inoculation et finissent par guérir ; ils succombent cependant quelquefois.

Chez tous les animaux, la sérosité de l'œdème et le suc musculaire contiennent le vibrion en abondance. La sérosité péritonéale, examinée sur lames, donne aussi l'apparence d'une culture pure. Pendant la vie, on ne trouve pas ou on trouve très rarement le vibrion septique dans le sang, mais il y passe assez rapidement après la mort.

II. *Diagnostic bactériologique des affections dues au vibrion septique.*

(1) **Sur le vivant.** — *Chez l'homme,* on examinera le liquide roussâtre des phlyctènes, l'œdème qui infiltre le membre envahi et les lambeaux mortifiés des tissus. *Chez le cheval,* on peut se trouver en présence de la gangrène traumatique ou de la péritonite septique. Dans le premier cas on s'adressera aux parties nécrosées, dans le second au sang de la circulation générale qui peut contenir (par exception) une assez grande quantité de vibrions. Rien de spécial à ajouter, concernant les septicémies gangreneuses des *bovidés,* du *mouton* et du *chien.*

On commencera toujours par l'étude microscopique. Puis, si l'on a affaire à des produits impurs, on les inoculera au cobaye, par injection ou insertion intramusculaires ; quand il y a des raisons de croire que les vibrions sont peu nombreux, on facilitera leur croissance *in vivo* en injectant en même temps de l'acide lactique à 1/5. Si l'on a affaire à des pro-

duits purs (sang, sérosités recueillies aseptiquement), on peut les inoculer d'emblée, ou mieux encore les laisser un jour à l'étuve, en ampoule scellée, pour les enrichir en germes. L'isolement du vibrion septique dans des tissus ou liquides, souillés de microbes étrangers, se fera, si l'on y tient, de la même façon que celui du b. tétanique. Lorsque les deux organismes coexistent, comme l'un de nous en a vu un cas chez l'homme, il faut, de toute nécessité, séparer les colonies (d'après le procédé Veillon, par exemple).

(2) **Sur le cadavre.** — On recueillera le sang, la sérosité musculaire, le liquide péritonéal et on les soumettra aux modes habituels d'examen.

On sait que les *cadavres des animaux charbonneux* sont rapidement envahis par le vibrion septique, devant lequel disparaît au fur et à mesure la bactéridie. D'où l'erreur célèbre de Jaillard et Leplat, rectifiée par Davaine. Lorsqu'on recevra du sang ou des viscères d'animaux, suspects d'avoir succombé au charbon, on devra donc procéder soigneusement à leur étude, afin de ne pas confondre les deux organismes. L'examen microscopique peut tromper, surtout quand les germes sont rares ; on ne négligera donc jamais de l'appuyer par des cultures (en gélatine) et des inoculations. Dans les plaques de gélatine, la bactéridie poussera seule, avec son aspect caractéristique. Quant aux inoculations, elles seront pratiquées sur le cobaye et la poule et on se souviendra que si le vibrion de Pasteur tue les deux animaux, la bactéridie épargne le second. L'exemple du charbon nous montre qu'une grande circonspection s'impose quand il s'agit d'attribuer un rôle pathogène aux vibrions rencontrés *post mortem*.

Pour les caractères différentiels entre le vibrion septique et le b. Chauvœi, nous renvoyons au chapitre « Charbon symptomatique ».

TÉTANOS

On sait que le tétanos apparaît, chez l'homme, soit à la suite de plaies (en particulier de plaies des extrémités ; de plaies souillées de terre ou de fumier ; de plaies contenant des corps étrangers), soit à la suite d'opérations chirurgicales. On connaît aussi le tétanos des nouveau-nés et le tétanos dit « spontané ». Celui-ci est dû, pour les uns, à une infection par l'intestin (le bacille s'y trouve en effet à l'état normal), pour les autres, au « réveil » de germes introduits antérieurement dans l'organisme (à la faveur d'une plaie, cicatrisée depuis longtemps). Les mêmes causes variées se retrouvent chez les animaux. On voit le tétanos se manifester, chez le cheval, consécutivement à des traumatismes du sabot ; chez le chien, après l'écrasement d'une patte ; chez la vache, après la parturition ou l'avortement ; chez les équidés et les bovidés, consécutivement à la castration, etc. Nous rappellerons que, chez l'homme comme chez les animaux, le bacille du tétanos (ou b. de Nicolaïer) se multiplie seulement, et encore très faiblement, au niveau de la porte d'entrée. Il ne se généralise jamais. Les symptômes qu'il provoque sont dus à la toxine, extrêmement active, qu'il sécrète.

I. *Principaux caractères du bacille tétanique.*

Caractères morphologiques.

Dans le pus tétanique, le b. de Nicolaïer peut se

présenter sous deux formes : asporulée (bacille mince, allongé, linéaire, parfois filamenteux) ou sporulée. Dans ce dernier cas, le bâtonnet est renflé à une de ses extrémités, qui porte une sphère réfringente ; cette disposition le fait ressembler à une épingle (fig. 124). Ces deux formes se retrouvent dans les cultures, où les bâtonnets se montrent légèrement mobiles jusqu'à la formation des spores. La mobilité est due à la présence de 20 à 30 cils vibratiles très longs, très flexueux, qui disparaissent exactement au moment de la sporulation (Kanthack et Connell). Le bacille s'allonge parfois en filaments, qui peuvent même se ramifier légèrement (Kanthack). Dans les vieilles cultures, les spores seules subsistent. Le bacille du tétanos se teinte par toutes les couleurs basiquesd'aniline et prend le Gram. La spore se colore par les méthodes spéciales, indiquées ailleurs.



Fig. 124. — Bacilles tétaniques, avec leurs spores caractéristiques.

Caractères de culture.

Le microbe de Nicolaïer se développe rapidement en bouillon, à 38° ou 40°. Après 24 heures, de fines bulles de gaz (CO^2 et CH^4) apparaissent par agitation. La réaction du milieu devient très alcaline. Le liquide dégage une odeur spéciale, pénétrante et désagréable ; vers le 15e jour, la culture se ralentit et commence à déposer.

Par piqûre dans la gélatine, de petits points nuageux apparaissent après 4 à 6 jours. On en voit par-

tir de fins rayons divergents. Plus tard, le milieu se liquéfie et des nuages floconneux tombent au fond du tube. Il y a assez souvent production de gaz, mais ceux-ci restent peu abondants. Sur plaques, on observe, du 4ᵉ au 6ᵉ jour, de petites sphères nuageuses, à centre blanchâtre et à périphérie formée de fins rayons. En grandissant, elles prennent un aspect mycoïde. La liquéfaction commence du 10ᵉ au 15ᵉ jour. En gélose par piqûre, on obtient un aspect assez analogue à celui qu'on observe en gélatine, mais le dégagement de gaz est plus abondant.

Le bacille du tétanos ne croît pas sur pomme de terre ; une seule fois, M. Vaillard a noté l'apparition d'une légère couche humide, où le microbe se présentait sous forme de bâtonnets longs et sans spores.

D'une façon générale, les liquides organiques sont peu favorables au développement. Le microbe de Nicolaïer pousse néanmoins sur sérum coagulé et dans le lait, qu'il ne coagule pas.

Caractères biologiques.

Le bacille du tétanos est loin de représenter un anaérobie strict. On peut, en effet, par cultures successives, l'habituer à vivre dans un air à peine raréfié. Il se développe à l'air en symbiose avec le b. subtilis, la sarcine orange..., etc. Il pousse entre 14° et 43°. Les spores sont extrêmement résistantes vis-à-vis de la chaleur et des autres agents de destruction. MM. Sabrazès et Rivière ont vu que les bacilles jeunes étaient agglutinables par le sérum des malades et par celui des animaux immunisés. D'où, d'après eux, une application possible au diagnostic du tétanos.

Caractères d'inoculation.

L'animal le plus sensible est la souris. Puis vien-

nent le rat blanc et le cobaye (d'après certains auteurs, le cobaye est plus réceptif que la souris). Le lapin est moins sensible, le chien très résistant. Le pigeon et la poule sont réfractaires.

Ainsi que nous l'avons dit, les cultures agissent exclusivement par la toxine spécifique. Elles reproduisent le tétanos, quel que soit le mode d'inoculation employé; seule l'ingestion échoue. En injection sous-cutanée, 1/500e de centimètre cube (bouillon) donne facilement la maladie au cobaye et à la souris après une incubation de 13 à 20 heures. La mort survient au bout de 36 à 40 heures. Chez le lapin, $0^{cc},5$ à $1^{cc},5$ sont nécessaires; l'incubation, de 2 à 3 jours dans la majorité des cas, peut s'élever jusqu'à 6 et même 8. La mort survient en 3 à 10 jours.

Si l'inoculation est faite sous la peau d'un membre, les contractures commencent par le point inoculé, s'étendent au membre correspondant, puis se généralisent. Si l'inoculation est faite sous la peau du flanc, on observe du pleurosthotonos, puis de la rigidité des membres antérieur et postérieur du même côté. A la suite de l'injection intramusculaire, le tétanos débute par le muscle inoculé; la contracture peut même y rester localisée, quand la dose est faible. L'injection dans les veines ou le péritoine provoque un tétanos généralisé d'emblée; l'injection sous la dure-mère un tétanos céphalique, puis généralisé. Il nous suffira de mentionner le tétanos cérébral (Roux et Borrel) et le tétanos splanchnique (Binot), très intéressants au point de vue expérimental, mais sans application diagnostique. Suivant les cas, ces divers modes d'inoculation donnent des accidents aigus ou chroniques. D'une façon générale, plus l'incubation est courte et plus l'affection est grave. Il n'est pas rare de voir guérir des cobayes, lorsque la période d'incubation atteint 4-5 jours, des lapins, quand elle en atteint 7-8.

A l'autopsie, on ne trouve pour ainsi dire aucune lésion locale. C'est à peine si on observe une légère hyperémie ou un peu d'œdème. On rencontre, par contre, un certain nombre d'altérations banales : congestion pulmonaire, ecchymoses sous-pleurales, apoplexie pulmonaire..., etc. La vessie est ordinairement distendue par une grande quantité d'urine ; celle-ci ne contient ni sucre, ni albumine. Ainsi que nous l'avons dit, le bacille du tétanos reste confiné au point d'inoculation et ne se généralise pas. Cependant lorsque les animaux ont été inoculés, dans le péritoine ou les veines, avec une très forte dose de culture et que les viscères sont ensemencés copieusement, on observe parfois des résultats positifs (Vaillard). D'après MM. Sanchez Toledo et Veillon, on réussit à obtenir des cultures avec le sang et les organes des animaux, quand on opère un certain temps après la mort. Le microbe de Nicolaïer se généraliserait donc *post mortem,* comme le vibrion septique. Toutefois, cet envahissement cadavérique est trop inconstant pour pouvoir être appliqué au diagnostic.

Le tétanos, obtenu par l'inoculation de pus tétanique ou de terre, diffère peu de celui qui est réalisé par l'injection des cultures. Le b. de Nicolaïer se retrouve ici un peu plus facilement au point inoculé et on peut faire 2 à 3 passages, tandis que, dans l'autre cas, il est très difficile d'en faire un seul (Sanchez Toledo et Veillon), voire impossible (Vaillard).

II. *Diagnostic bactériologique du tétanos.*

Il peut se poser pendant la vie ou à l'autopsie. La constatation des bacilles tétaniques *dans une plaie* est souvent fort difficile. Cela tient, d'une part à leur petit nombre, de l'autre à l'abondance des microbes étrangers auxquels ils sont d'ordinaire associés. On devra

néanmoins les rechercher, en préparant des lames avec le pus, la sérosité, ou les produits membraneux, récoltés au niveau de la plaie. Parmi ces lames, les unes seront colorées par la thionine phéniquée, les autres par la méthode de Gram. Il est bon d'être averti qu'un grand nombre de préparations seront toujours nécessaires. Malgré tout, il arrivera souvent qu'on ne découvre aucune forme sporulée ; comme, d'autre part, les formes végétatives sont peu caractéristiques, il faudra recourir aux cultures et à l'inoculation.

Le pus ou le produit de raclage de la plaie seront dilués dans du bouillon frais et ensemencés dans le vide, à 38°-39°. Le milieu se troublera rapidement et, dès le 5e ou 6e jour, on pourra trouver des bacilles en épingle mêlés à d'autres microbes. La constatation de ces formes en épingle est suffisante pour le diagnostic. Si l'on désirait obtenir le microbe de Nicolaïer à l'état de pureté, on aurait recours au procédé préconisé par MM. Vaillard et Vincent. Un peu de la culture impure, renfermé dans une ampoule de verre, est soumis, pendant 1 à 2 minutes, à la température de 100° (insuffisante pour tuer les spores tétaniques, mais suffisante d'ordinaire pour éliminer la plupart des microbes étrangers). Le contenu de l'ampoule est porté ensuite dans du bouillon frais et ensemencé à l'abri de l'air. En répétant 2 ou 3 fois le chauffage et la culture, il est possible d'obtenir le bacille du tétanos à l'état de pureté. Le procédé indiqué par M. Kitasato diffère du précédent. Le pus tétanique est cultivé sur sérum coagulé ou sur gélose. La culture impure, obtenue après 24 heures de séjour à 36°-38°, est chauffée 3/4 d'heure à 1 heure au bain-marie, à 80°. On termine par des isolements en plaques de gélatine.

Le pus ou le produit de raclage de la plaie peuvent également être dilués dans un peu de bouillon et injectés dans le tissu cellulaire sous-cutané ou les

muscles de la souris, du rat ou du cobaye. Le lieu d'élection est représenté par la face postérieure de la cuisse. La contracture du membre inoculé, très facile à observer, trahit, de façon aussi précoce que possible, l'éclosion de la maladie.

On se servira, pour le *sérodiagnostic*, de cultures jeunes en bouillon. La réaction pourra être recherchée à la fois au microscope et par l'ensemencement. Le pouvoir agglomérant du sérum de l'homme ou des animaux, atteints de tétanos naturel, se montre ordinairement faible et varie entre 1/10° et 1/20°. Il ne faut donc pas s'attendre à trouver ici l'agglutination intense et pathognomonique que l'on observe chez les typhiques.

Un *procédé de diagnostic*, malheureusement *infidèle*, consiste à injecter à la souris de 2 à 3 centimètres cubes du sang du malade. L'animal succombe parfois à la toxine en circulation (Kartulis).

Sur le cadavre, la recherche du microbe, dans les organes examinés tardivement, n'est susceptible d'aucune application pratique. On préférera, aux examens microscopiques et aux cultures, les inoculations pratiquées avec la région malade. On excisera toute la plaie, puis on la divisera en un certain nombre de fragments, que l'on inoculera par insertion dans le tissu cellulaire sous-cutané, ou mieux encore dans les muscles de plusieurs cobayes.

III. *Sérothérapie du tétanos.*

Emploi du sérum antitétanique en médecine humaine.

Préventivement. Le sérum sera injecté aux sujets atteints des divers traumatismes qui exposent particulièrement au développement du tétanos (plaies par

écrasement; plaies contuses, souillées de terre, de fumier, de vase; plaies compliquées de corps étrangers, etc.). 10 centimètres cubes suffisent d'ordinaire; s'il s'agit de plaies particulièrement souillées et difficiles à nettoyer, on fera une nouvelle injection, une semaine après la première.

Curativement. Le sérum est impuissant contre les formes rapides; il est très utile dans les cas lents à incubation prolongée. On injectera de 50 à 100 centimètres cubes, en une ou deux fois. L'injection intracérébrale d'antitoxine, qui donne de si merveilleux résultats chez le cobaye, n'a pas encore réalisé, chez les autres animaux et l'homme, les espérances qu'on avait conçues à la suite des recherches de MM. Roux et Borrel. En attendant qu'on perfectionne cette méthode, il vaut mieux s'en abstenir.

Emploi du sérum antitétanique en médecine vétérinaire.

Préventivement. On injectera le sérum aux animaux atteints de traumatismes analogues à ceux que nous avons mentionnés plus haut et aussi à la suite des opérations qui se compliquent le plus souvent de tétanos (castration, amputation de la queue, interventions portant sur le sabot, etc.). On fera deux injections de 10 centimètres cubes, à 8 jours d'intervalle. L'emploi du sérum antitétanique à titre préventif a fait presque complètement disparaître les tétanos postopératoires.

Curativement. Le tétanos est souvent moins grave chez les animaux que chez l'homme. Aussi le traitement par l'antitoxine donne-t-il de meilleurs résultats. M. Nocard conseille d'injecter le premier jour 50 centimètres cubes et les jours suivants une dose variant de 20 à 50 centimètres cubes, selon les cas.

MORVE

I. *Principaux caractères du bacille de la morve.*

Caractères morphologiques.

Le bacille de la morve représente un bâtonnet assez grêle, tantôt droit, tantôt légèrement incurvé. Dans les cultures, il est un peu moins long et moins volumineux que dans les tissus animaux. Il est immobile. Il se colore, en culture, par toutes les couleurs basiques d'aniline, mais il se teinte assez mal au sein des produits pathologiques ; pour le rechercher sur lames et dans les coupes, on se servira de préférence de la thionine phéniquée. Il ne prend point le Gram. Il présente souvent des espaces incolores, qu'on ne prendra pas pour des spores. Notons enfin la fréquence des formes rameuses sur pomme de terre et des formes d'involution dans les vieilles cultures.

Caractères de culture. — Caractères biologiques.

C'est sur pomme de terre que le développement du bacille de la morve est le plus typique. Le long de la strie d'ensemencement, apparaît, au bout de 36 à 48 heures, un enduit légèrement jaunâtre qui, les jours suivants, tend à devenir de plus en plus foncé et présente finalement une coloration chocolat (parfois, cependant, la teinte reste jaune). En même temps, la pomme de terre noircit dans sa totalité.

Dans le bouillon, il se forme, en 36 à 48 heures, un trouble général du liquide qui, par agitation, prend un aspect moiré. En laissant les cultures au repos, on voit apparaître, après quelques jours, un voile grisâtre à la surface du bouillon ; cet aspect n'a rien de caractéristique. Le bacille morveux se développe fort bien sur gélose. Il y forme une strie blanchâtre, sans particularités distinctives. Il pousse mieux encore sur gélose glycérinée. Il aime beaucoup du reste tous les milieux à base de glycérine. Il croît mal en gélatine ; celle-ci n'est pas liquéfiée. Il coagule le lait en milieu neutre ou alcalin, par formation de présure ; mais il n'y a pas de peptonisation ultérieure.

Caractères d'inoculation.

L'animal réactif, pour le diagnostic de la morve, est le cobaye mâle. Deux cas peuvent se présenter, suivant que la matière à inoculer (pus, paroi d'ulcération, etc.) provient d'un foyer fermé ou ouvert. Dans le premier cas, l'inoculation se fera d'emblée par injection ou insertion intrapéritonéales. Deux ou trois jours après, on constate un gonflement marqué des bourses. Les testicules ne peuvent plus être refoulés dans l'abdomen. La peau, au niveau du scrotum, devient tendue, luisante et prend une coloration rouge, puis violette. Au toucher, on sent nettement une élévation de la température locale. La tuméfaction augmente les jours suivants. Du 8e au 15e jour, elle est très considérable et il se produit souvent à ce moment des ulcérations étendues, à bords taillés à pic, à fond jaunâtre, entourées d'une zone rouge vif. La mort survient plus ou moins vite, suivant l'échantillon employé. A l'autopsie, on constate qu'il s'agit d'une vaginalite suppurée. Le pus est épais, jau-

nâtre et contient beaucoup de bacilles (fig. 125). L'épididyme est œdématié, le péritoine injecté. Le foie et la rate sont hypertrophiés et présentent à leur surface de petites granulations gris jaunâtre. Dans le second cas, c'est-à-dire s'il s'agit d'un foyer ouvert, l'inoculation se pratiquera de préférence sous la peau de la cuisse. Il se forme bientôt un abcès, suivi d'une ulcération, puis de la tuméfaction des ganglions correspondants ; à ce moment, on enlèvera les glandes hypertrophiées. On les broiera dans un verre flambé avec un peu de bouillon stérilisé. On fera des préparations, pour s'assurer que le b. morveux existe à l'état de pureté et, avec la pulpe diluée, on inoculera le même cobaye par injection intrapéritonéale : après quelques jours apparaissent les lésions typiques. On ensemencera, en même temps, un ou deux tubes de pommes de terre. Ce procédé permet d'arriver rapidement au diagnostic. En effet, lorsqu'on laisse évoluer spontanément les lésions, après l'inoculation sous-cutanée, la tuméfaction des bourses n'est pas fatale ; elle n'apparaît guère que dans la moitié des cas. De plus, quand elle se produit, elle ne se manifeste que du 10e au 12e jour et la mort ne survient que du 25e au 50e.

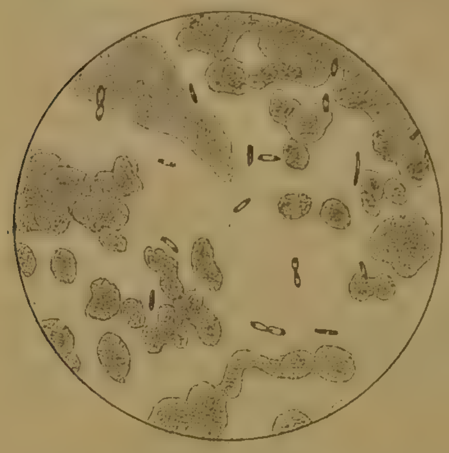


Fig. 125. — Bacille de la morve, dans la vaginalite du cobaye, d'après Besson.

L'âne est également un excellent réactif. Il meurt toujours de morve aiguë, en moins de 15 jours. Pour

l'inoculer, on scarifie le front; puis, quand le sang s'est arrêté, on frotte doucement, avec un linge stérile imbibé du produit pathologique et tenu dans une pince. On a soin de maintenir les incisions béantes, par tension de la peau. Deux ou trois jours plus tard, la fièvre apparaît. Du 4e au 8e jour, il se forme des chancres morveux très nets, puis l'état général devient mauvais et l'animal succombe. A l'autopsie, on trouve, sur la muqueuse des voies aériennes, une éruption de boutons farcineux et, dans le poumon, des infarctus grisâtres, à base pleurale, très caractéristiques. On constate quelquefois une éruption généralisée de tubercules miliaires, sur le poumon et les différents viscères.

Le lapin est assez résistant. Pour le tuer sûrement, il faut injecter les doses massives de cultures très virulentes, par la voie intraveineuse. L'inoculation sous-cutanée détermine une lésion locale, qui guérit assez vite.

La souris des champs meurt en 3 à 7 jours, avec des granulations morveuses viscérales. La souris blanche est plus résistante, mais elle succombe aussi, pourvu que le virus soit un peu actif. Contrairement aux assertions de divers auteurs, l'un de nous (étudiant cette question avec le Dr Morax) n'a jamais vu la souris blanche résister à la morve. Un grand nombre d'échantillons ont été cependant essayés. On peut en conclure que la souris blanche pourrait être employée, au cas échéant, sans grand risque d'insuccès.

Le chien est assez réfractaire. L'inoculation, par scarifications sur le front, détermine, après 3 ou 4 jours, une plaie ulcéreuse, taillée à pic, à fond grisâtre, donnant lieu à un écoulement purulent, filant, oléiforme. Au bout de quelque temps, il se forme une croûte, sous laquelle la suppuration continue. La cicatrisation de l'ulcère se fait habituellement du

20[e] au 30[e] jour. Parfois, on observe des ulcérations discrètes sur d'autres points du tégument ou sur la muqueuse nasale.

Le chat, plus réceptif que le chien, peut être inoculé par scarifications. Il survient un chancre typique au bout de 3 à 7 jours et l'animal meurt après 3 semaines.

L'inoculation au cheval morveux lui-même est très infidèle ; c'est seulement dans un tiers des cas que les scarifications sur la peau du front déterminent de l'élévation de la température, de la tuméfaction des ganglions de l'auge et du jetage. La mort ne survient qu'après un temps fort variable. A l'autopsie, on rencontre ordinairement des chancres de la pituitaire et des tubercules pulmonaires. Le mulet est plus sensible que le cheval.

Répartition du bacille morveux dans l'organisme des solipèdes.

Le bacille de la morve se rencontre dans les abcès farcineux, les ganglions, les tubercules viscéraux, les infarctus. Dans le jetage et la sanie des chancres, il existe, mais plus clairsemé. Enfin, il ne passe qu'exceptionnellement dans le sang.

II. *Diagnostic de la morve.*

Nous étudierons, tout d'abord, le diagnostic chez le cheval, puis nous indiquerons les quelques particularités qu'il présente chez l'homme.

Diagnostic de la morve chez le cheval.

L'examen microscopique, des frottis préparés avec le pus et surtout avec le jetage, ne donne de résultats

nets que lors de lésions aiguës. Si, au microscope, le produit paraît pur ou presque pur, on fera des séparations sur pomme de terre; dans le cas contraire, on séparera sur gélose et on repiquera les colonies sur pomme de terre, pour avoir l'aspect type. L'étude histologique est toujours insuffisante pour asseoir le diagnostic. Les cultures, par contre, peuvent réussir là où l'inoculation échoue et il est toujours indiqué d'y recourir. En effet, certains produits, le jetage par exemple, renferment fréquemment très peu de bacilles et leur inoculation donne assez souvent des résultats négatifs ; d'autant que d'autres organismes peuvent coexister en abondance, dans le cas de lésions ouvertes et amener prématurément la mort des animaux. Ainsi que nous l'avons déjà dit, les inoculations seront pratiquées, soit chez le cobaye (voies sous-cutanée ou intrapéritonéale), soit chez l'âne, le chat ou le chien (par scarifications). Il faut savoir que la vaginalite du cobaye ne constitue pas, cliniquement, un signe pathognomonique de la morve ainsi qu'on l'avait cru pendant longtemps. Il existe, en effet, divers microbes, notamment celui de la lymphangite pseudo-farcineuse du cheval, décrit par M. Nocard, qui produisent aussi de la vaginalite, par inoculation intrapéritonéale chez le cobaye.

Le moyen le plus simple et le plus pratique d'assurer le diagnostic de la morve, réside dans l'*emploi de la malléine*, dont nous avons donné ailleurs le mode de préparation. Pour fournir des résultats probants, la malléinisation doit être pratiquée en s'entourant de certaines précautions, qui sont les suivantes. On prendra la température des chevaux, pendant les 2 ou 3 jours qui précèdent l'épreuve et on inoculera seulement les animaux rentrés à l'écurie depuis au moins 24 heures. Les variations atmosphériques peuvent, en effet, amener de la fièvre et fausser les résultats.

D'autre part, les chevaux dont la température est supérieure à 39° ne seront pas inoculés. De 6 à 10 heures du soir, autant que possible, on injectera, sous la peau de l'encolure, 2 centimètres cubes 1/2 de malléine diluée et on prendra la température, 9, 12, 15 et 18 heures après l'injection. Chez les chevaux morveux, la fièvre débute d'ordinaire 8 heures après l'inoculation; elle atteint son maximum de la 10ᵉ à la 12ᵉ heure, rarement entre la 16ᵉ et la 20ᵉ. Le retour à la normale s'effectue de 48 à 60 heures après l'injection. Outre cette réaction thermique, on observe une réaction locale et une réaction organique. La réaction locale se traduit par une tuméfaction inflammatoire chaude et douloureuse, d'où partent des traînées lymphangitiques qui se dirigent vers les ganglions voisins ; ces phénomènes s'accroissent pendant 24 à 36 heures, puis disparaissent en 5 à 6 jours. La réaction organique se manifeste par de l'abattement, de l'anxiété, de l'anorexie, des frissons. Le poil est piqué, la respiration précipitée, l'état général misérable. Si la réaction thermique est supérieure à 1°,5 et si la réaction organique l'accompagne, la morve est certaine. Si la réaction thermique existe seule, l'animal doit être tenu pour suspect et on l'inoculera à nouveau après un mois. Enfin, une élévation de température inférieure à 1° n'a pas de signification. Il faut se méfier des chevaux gourmeux, qui offrent des oscillations thermiques étendues. On se rappellera que ces oscillations sont très irrégulières et qu'elles ne s'accompagnent pas de réaction organique.

On le voit, la malléinisation laisse parfois dans le doute. D'autre part, l'inoculation demeure dans certains cas négative ; elle peut même tromper. Le mieux est donc de combiner, toutes les fois qu'on le peut, les diverses méthodes de diagnostic : examen microscopique, cultures, inoculations, malléinisation

Souvent, ce n'est pas sur le cheval vivant, mais *sur le cadavre* qu'on devra faire le diagnostic. On recueillera purement les divers produits et on les soumettra à l'étude bactériologique. Il faut savoir que, dans les vieilles lésions pulmonaires et dans les tubercules translucides, le virus est souvent difficile à déceler.

Diagnostic de la morve chez l'homme.

Chez l'homme, le diagnostic clinique de la morve est le plus souvent très délicat, pour ne pas dire impossible. La maladie revêt parfois la forme d'une *pseudo-dothienentérie*, au cours de laquelle se produisent des abcès ; en conséquence, des suppurations survenant au milieu d'un état typhique indéterminé, doivent toujours faire penser à la morve. Il existe aussi une *forme pseudo-erysipélateuse*, une *forme nasale aiguë*, et une *forme farcineuse chronique* succédant à une fausse tuberculose pulmonaire ; ces deux derniers types rappellent bien la morve du cheval. Citons enfin la *farcinose mutilante de la face*, qui simule des lésions épithéliomateuses, syphilitiques ou tuberculeuses. En présence de toute affection cutanée ou muqueuse grave, dont la nature reste douteuse, il mporte donc de rechercher le bacille de la morve. Cette recherche est tout particulièrement indiquée orsque le malade se trouve, de par sa profession, en ontact avec des chevaux. L'examen microscopique es produits morveux humains ne donne souvent ue des résultats négatifs ou douteux. Il faut avoir ecours à la culture et à l'inoculation du pus, des anies, etc. Il va de soi que la malléinisation ne saurait re usitée. D'autre part, des différents travaux qui ont aru sur le *sérodiagnostic* de la morve, il ne se dégage en de net jusqu'à présent.

III. *Prophylaxie de la morve chez le cheval.*

Nous dirons, en terminant, un mot de la malléinisation, appliquée à la prophylaxie de la morve équine. La question intéresse tous ceux qui s'occupent de la préparation des sérums thérapeutiques et, d'autre part, il n'est pas de bactériologue qui ne soit fréquemment consulté au sujet de l'application de la malléine.

1° Dans un *milieu infecté*, on commencera par abattre les chevaux cliniquement morveux et par faire une désinfection rigoureuse ; on soumettra ensuite tous les autres animaux à la malléinisation. Ceux qui réagissent sont déclarés suspects. On les isole, on les marque et on les soumet pendant un an à la surveillance sanitaire. Ils peuvent être utilisés, à condition de ne pas présenter de signes cliniques, de ne jamais boire aux abreuvoirs communs et de ne jamais entrer dans une autre écurie. Pendant la surveillance ils sont soumis tous les deux mois à une injection de malléine. Ceux qui supportent deux injections consécutives sans réagir sont considérés comme guéris et rendus à leurs propriétaires. Ceux qui présentent des signes cliniques de morve sont abattus. Les animaux qui n'ont pas réagi seront utilisés, à condition d'être rigoureusement isolés des suspects. On désinfectera les objets à leur usage et leur écurie. Ils ne pourront toutefois être vendus pendant les deux mois qui suivent la malléinisation (Comité consultatif des épizooties — 1894). 2° Tout *cheval nouvellement acheté* sera isolé et malléiné.

TUBERCULOSE

I. *Principaux caractères du bacille de Koch.*

Caractères morphologiques.

La bacille de la tuberculose représente un bâtonnet fin, droit ou légèrement incurvé, mesurant en longueur le quart ou la moitié du diamètre d'une hématie humaine (fig. 126). Dans les cultures et même dans les crachats, il n'est pas rare de rencontrer des formes filamenteuses, bourgeonnantes, ramifiées, prouvant que *le bacille de Koch appartient réellement à la famille des streptothricées* (fig. 127). Cette opinion, soutenue pour la première fois par M. Metchnikoff, est corroborée par les caractères de culture et d'inoculation de l'organisme tuberculeux.

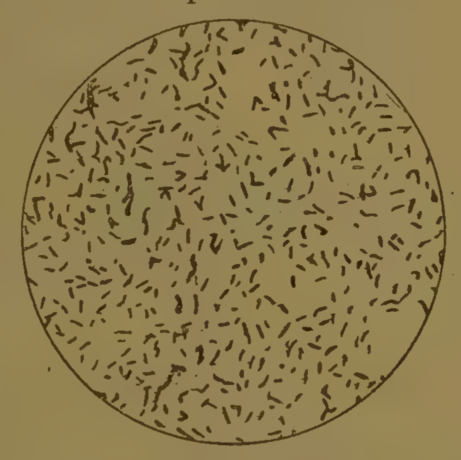


Fig. 126. — Bacille tuberculeux. Culture récente sur gélose glycérinée.

Le b. de Koch se montre toujours immobile et ne produit pas de spores. Il se colore difficilement, mais retient fortement les matières colorantes ; c'est sur cette propriété que se basent les méthodes usitées pour

le mettre en évidence. Il prend le Gram et apparaît alors teinté « en pointillé » ; cet aspect se retrouve souvent aussi, notamment dans les crachats, lorsqu'on fait usage de la méthode d'Ehrlich. C'est à l'aide de ce dernier procédé, ou de la modification apportée par Kühne, que l'on colorera le b. tuberculeux.

Sur les milieux solides, les b. de Koch se groupent en longues rangées parallèles, sinueuses, entortillées,

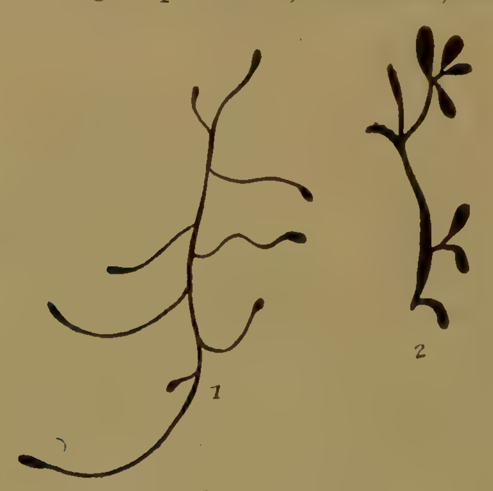


Fig. 127. — 1. Streptothricée. 2. Forme rameuse du b. tuberculeux (d'après Coppen Jones).

très caractéristiques (fig. 128). On se rend bien compte de cette disposition, en appliquant une lamelle à la surface d'une culture (sur gélose glycérinée par exemple). On appuie légèrement et on enlève la lamelle sans frotter. Ce mode de préparation, dû à M. Koch, a reçu de lui le nom significatif de *Klatschpräparat* (préparation par décalque).

Caractères de culture.

Le b. tuberculeux présente 3 types principaux : *b. humain, b. aviaire* et *b. pisciaire*. Le premier se ren-

contre surtout dans la tuberculose des mammifères, le second surtout dans la tuberculose des oiseaux, le troisième exclusivement dans la tuberculose des poissons. Nous indiquerons d'abord leurs caractères différentiels, au point de vue des cultures et des réactions expérimentales, puis nous étudierons leurs connexions. Nous décrirons, à la fin de cet alinéa, les

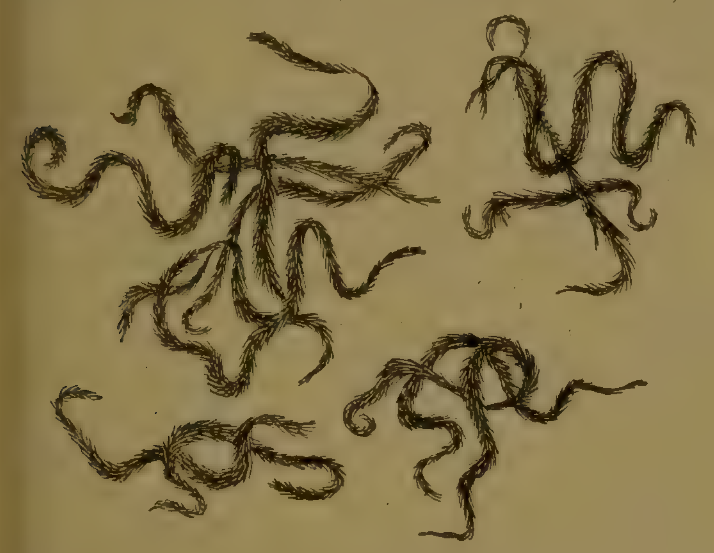


Fig. 128. — Préparation par décalque du bacille tuberculeux.

« cultures homogènes » de MM. Arloing et Courmont.

Bacille humain. — Les premières cultures sont assez difficiles à obtenir. Nous dirons plus tard comment on peut y arriver, en partant des produits pathologiques naturels. En partant des produits pathologiques expérimentaux, on réussit plus souvent. Le meilleur procédé, indiqué par M. Koch, est le suivant. On inocule un cobaye sous la peau et, lorsque l'animal est bien infecté, on le sacrifie. On broie aseptiquement le tissu des ganglions ou de la rate (le mieux est d'opérer dans un mortier stérilisé) et,

s'il contient beaucoup de bacilles, on l'ensemence abondamment sur des tubes de sérum glycériné. Il faut faire un grand nombre de tubes, car la plupart d'entre eux restent stériles. Les cultures sont placées à 38°,5. Dès qu'apparaissent les colonies caractéristiques, on les repique sur le même milieu (il faut faire encore ici plusieurs tubes). Ce n'est qu'à la 5ᵉ génération environ qu'on peut employer la gélose glycérinée. En partant de celle-ci, on ensemencera avec succès le bouillon (en surface) et la pomme de terre glycérinés. De la pomme de terre glycérinée, on peut passer à la pomme de terre simple.

Sur sérum glycériné et en partant d'un ganglion ou d'une rate tuberculeux, on voit apparaître, au bout de 2 semaines, des grains blanchâtres, arrondis, assez fermes. Après 3 semaines, ils deviennent secs, ternes, écailleux. Lors du 4ᵉ repiquage, la culture est plus abondante et réussit plus régulièrement. Elle offre l'aspect d'une couche mince, sèche, surmontée de saillies verruqueuses. Elle s'étale à la surface du liquide de condensation, sans le troubler. La culture sur gélose glycérinée montre de petits grains isolés, d'un blanc mat. Ils grandissent et finissent par recouvrir tout le milieu, sous forme d'un enduit blanchâtre, hérissé de saillies verruqueuses. Les microbes se développent aussi en voile, à la surface du liquide de condensation. Si l'on ensemence le b. de Koch sur du bouillon glycériné, la culture est abondante. On observe une membrane sèche, blanche, verruqueuse, qui recouvre tout le liquide et monte sur les parois du vase. Si l'on ensemence par immersion, le développement est au contraire très lent et se fait sous l'aspect de petites masses blanches mûriformes. Sur pomme de terre glycérinée, on observe une couche sèche, écailleuse, épaisse, d'un blanc jaunâtre.

Bacille aviaire. — Les premières cultures sont faciles à obtenir sur les milieux glycérinés et, le plus souvent, sur les milieux ordinaires. L'optimum thermique est encore ici de 38°,5, mais le bacille peut pousser de 30° à 40° (et même au-dessus).

Sur sérum glycériné, on voit apparaître, en 8 à 10 jours, des taches arrondies, blanchâtres, humides. Après 2 à 3 semaines, elles se réunissent et forment une couche continue, mamelonnée, d'un blanc mat, grasse et molle, plus épaisse que la culture du b. humain. Sur gélose glycérinée, c'est encore un dépôt humide, lisse, d'aspect gras. Dès la seconde génération la surface se plisse abondamment. Si l'on ensemence en voile le bouillon glycériné, la croissance est rapide. On observe une membrane épaisse, d'un blanc sale, plissée et verruqueuse. Si l'on ensemence par immersion, il ne se développe que des flocons très ténus au fond du vase. Comme le b. humain, le b. aviaire est donc très aérobie. Sur pomme de terre glycérinée, la couche se montre plus abondante, plusmolle et plus grasse que celle que forme le b. humain.

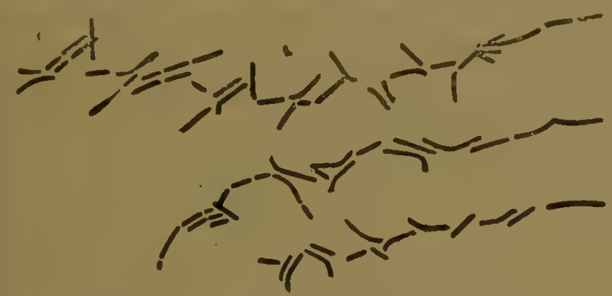


Fig. 129. — Bacille tuberculeux pisciaire.

Bacille pisciaire. — Ce bacille (fig. 129), découvert par MM. Dubard, Bataillon et Terre, dans la tuberculose naturelle des poissons, peut se développer à 12° (quatre fois plus lentement, il est vrai, qu'à 23°).

L'optimum thermique est de 23°. On obtient une croissance abondante et rapide dans les milieux ordinaires.

Sur gélose, les bacilles forment une couche crémeuse, qui atteint son développement maximum en 3 jours. Sur pomme de terre, on observe, après le même temps, un semis de grains offrant la consistance du savon. Dans le bouillon, ce sont des flocons réunis au fond du vase ; à la surface du bouillon, c'est un voile épais.

Il est assez difficile d'habituer le b. pisciaire à la température de l'étuve, mais on y arrive cependant, en procédant méthodiquement. Le développement n'a lieu qu'après 15 jours et les cultures ressemblent à celles du b. humain.

Cultures homogènes d'Arloing et Courmont. — Pour rechercher le pouvoir agglutinant du sérum des tuberculeux, MM. Arloing et Courmont se servent de cultures homogènes du b. humain, qu'ils préparent comme il suit. On part de cultures sur pomme de terre glycérinée (les pommes de terre trempent dans l'eau glycérinée à 6 pour 100 et non dans le bouillon glycériné, comme c'est le cas habituel). Ces cultures deviennent abondantes après quelques passages. On les ensemence alors en bouillon peptonisé (1 pour 100) et glycériné (6 pour 100), stérilisé à 110° et réparti dans des vases cylindriques. On prend soin d'agiter chaque jour les cultures. Celles-ci poussent, en troublant uniformément le milieu. La préparation est assez délicate.

Caractères d'inoculation.

Il faut encore ici distinguer les *trois types : humain, aviaire et pisciaire.*

Bacille humain. — Le réactif par excellence est le cobaye. A la suite de l'injection, sous la peau, d'un produit tuberculeux ou d'une culture pure, on observe, au bout de quelques jours, un nodule qui ne tarde pas à se ramollir, donnant issue à un pus jaunâtre, épais, dans lequel les bacilles sont abondants. Il se forme ainsi un ulcère à bords décollés, qui persiste jusqu'à la mort. Quelques jours après l'apparition du nodule, les ganglions correspondant à la région inoculée s'engorgent, puis l'animal s'émacie et succombe, en moyenne de 3 à 8 semaines après l'inoculation. A l'autopsie, on trouve les ganglions hypertrophiés et caséeux à leur centre. La rate est énorme, jaunâtre ; elle est farcie de masses tuberculeuses, qui se montrent aussi (quoique avec une moindre abondance) dans le foie et le poumon. La mort est souvent plus rapide, à la suite de l'inoculation intra-péritonéale ; elle survient d'ordinaire au bout de 2 à 6 semaines. A l'autopsie, on trouve l'épiploon rétracté sous forme d'un boudin fibro-caséeux. La rate et le foie sont énormes et semés de tubercules. Ceux-ci se montrent très nombreux également dans le poumon. Pendant la vie, les seuls phénomènes apparents sont l'émaciation précoce et le développement des ganglions mésentériques. L'inoculation dans le poumon fait périr le cobaye en 2 semaines, à la suite d'une pneumonie caséeuse. Un semis de granulations tuberculeuses se voit tout autour du foyer. L'inoculation dans les veines amène ordinairement la mort en 10 à 20 jours, par granulie. Les tubercules sont abondants dans le poumon, rares dans le foie, absents dans les autres organes. Si la mort est plus tardive, tous les ganglions sont devenus caséeux, le foie et la rate renferment de gros tubercules jaunes.

Le lapin se montre beaucoup moins sensible que le cobaye. Il succombe dans la majorité des cas, mais l'évolu-

tion des lésions est plus lente. L'inoculation sous-cutanée produit un abcès local, suivi d'une caséification des ganglions correspondants. La mort survient au bout d'un temps excessivement variable. A l'autopsie, on trouve une éruption tuberculeuse dans les organes (la tuberculose pulmonaire est constante). Les lésions produites par l'inoculation dans le péritoine, dans le poumon, dans les veines, sont très analogues à celles qu'on observe chez le cobaye, mais la mort se produit au bout d'un laps de temps très irrégulier. Pour suivre l'évolution des lésions et arriver à un diagnostic plus rapide, on introduit fréquemment le virus dans la chambre antérieure. Après réunion de la plaie cornéenne, on ne remarque en général aucune réaction pendant les 3 ou 4 premiers jours. Vers le 5e ou le 6e, on aperçoit, au niveau de la matière inoculée, un petit point blanc jaunâtre qui augmente de volume, tandis que d'autres granules analogues se développent dans le segment inférieur de l'iris. A ce moment, on voit en général se produire, dans la zone incisée de la cornée, une raie blanchâtre, vers laquelle la conjonctive envoie des prolongements vasculaires. Cette partie se ramollit, l'ancienne incision se rouvre et il se manifeste un prolapsus de l'iris. Ultérieurement, le processus tuberculeux gagne les membranes profondes de l'œil, lequel est détruit peu à peu par panophtalmie. La généralisation viscérale et la mort peuvent survenir très tardivement (après plusieurs mois).

M. Arloing a proposé d'utiliser la moindre réceptivité du lapin (comparé au cobaye) pour différencier les lésions dites scrofuleuses de la tuberculose proprement dite. Les altérations scrofuleuses, qui déterminent toujours la tuberculose chez le cobaye, ne donneraient pas de lésions chez le lapin, au moins par inoculation sous-cutanée ; aussi seraient-elles

dues, d'après M. Arloing, à des races atténuées du bacille tuberculeux. On peut interpréter ces phénomènes en admettant qu'il n'y a là qu'une simple question de quantité des germes inoculés.

Le chien se montre réceptif; l'inoculation intra-péritonéale le fait mourir en deux mois ; à l'autopsie, on trouve une péritonite, avec épanchement abondant et adhérences intestinales ; il existe en outre de la tuberculose pulmonaire. La mort survient plus rapidement, à la suite de l'inoculation intraveineuse. On observe alors dans le poumon des tubercules miliaires et parfois des cavernes. Le foie est gros et il existe une ascite abondante. Enfin tous les organes sont remplis de bacilles de Koch.

Le bœuf se montre sensible, le cheval et le porc également. M. Nocard a réalisé une véritable culture du b. tuberculeux *in vivo*, en l'injectant dans le trayon des vaches en lactation ; les animaux meurent en quelques semaines, avec retentissement ganglionnaire, mais sans métastases.

Le chat offre la même réceptivité que le chien. Le mouton, la chèvre, l'âne et le rat résistent beaucoup. Enfin, les oiseaux sont réfractaires (ou à peu près), à l'exception du perroquet qui prend au contraire très facilement la tuberculose, par inoculation du b. humain.

Bacille aviaire. — Le cobaye, inoculé sous la peau, offre, *loco læso*, un nodule suivi d'un abcès ; mais, d'ordinaire, celui-ci ne s'ouvre point. La réaction ganglionnaire reste modérée. L'animal meurt en 2 à 3 semaines (chiffre moyen) sans grande émaciation. A l'autopsie, on ne rencontre généralement que l'abcès d'inoculation et l'hyperémie des ganglions correspondants ; les bacilles sont rares dans ces lésions et dans les viscères. A la suite de l'injection intrapéritonéale, la mort n'est guère plus rapide. A l'autopsie, on

constate exceptionnellement la rétraction de l'épiploon ; les viscères ne montrent pas de tubercules visibles. Ici encore la mort survient par intoxication, sans grande multiplication des germes introduits. Mêmes résultats, lors de l'inoculation intrapulmonaire. A part un certain degré de congestion locale, on ne note rien de caractéristique. Enfin, l'injection dans les veines tue en une dizaine de jours, sans tuberculose apparente.

Si on inocule le lapin sous la peau, il offre un abcès local, sans réaction ganglionnaire. La mort survient en quelques semaines. A l'autopsie, on ne rencontre pas de tubercules, mais les bacilles sont très nombreux dans les viscères. L'injection dans le péritoine ou dans le poumon tue en 10-15 jours ; la rate se montre très hypertrophiée, les autres lésions sont les mêmes que lors de l'injection intraveineuse. Celle-ci tue en 2 semaines, avec émaciation progressive. A l'autopsie, on trouve de la tuméfaction du foie et surtout de la rate et une quantité considérable de bacilles dans les viscères. C'est la tuberculose sans tubercules apparents, ou tuberculose septicémique, ou encore *tuberculose du type Yersin*. L'inoculation dans la chambre antérieure détermine la fonte caséeuse de l'œil ; l'animal survit pendant plusieurs mois et ne présente qu'exceptionnellement des tubercules apparents. On voit donc que le b. aviaire détermine chez le cobaye une intoxication et chez le lapin une véritable septicémie.

Le chien, ainsi que les autres mammifères, résiste beaucoup au b. aviaire. La poule et le pigeon, au contraire, se montrent sensibles à ce bacille, comme cela était à prévoir, puisque c'est un organisme provenant presque toujours des oiseaux. L'inoculation intraveineuse tue dans un temps variable (quelques semaines ou quelques mois). La présence d'une

éruption granulique est inconstante, mais les viscères renferment toujours beaucoup de bacilles. L'injection intrapéritonéale produit une tuberculose du mésentère et des viscères abdominaux. Enfin, l'inoculation dans le pectoral détermine une caséification locale et une généralisation modérée du b. aviaire, sans tubercules viscéraux.

Bacille pisciaire. — Inoffensif pour les mammifères et les oiseaux, il se montre pathogène pour divers animaux à sang froid (Dubard). M. Ledoux-Lebard a inoculé la grenouille avec succès. Lorsque la mort survient rapidement, on ne constate pas la présence de granulations ; lorsqu'elle survient lentement, on peut rencontrer des tubercules fins et confluents sur le foie et les reins. Si l'on soumet les animaux inoculés à une température supérieure à 30°, la maladie se trouve considérablement ralentie.

II. *Rapports des bacilles humain, aviaire et pisciaire.*

Nous avons dit ailleurs comment M. Nocard était arrivé, par la culture en sac chez le coq, à transformer le b. humain en b. aviaire. Ses recherches démontrent définitivement qu'entre les deux organismes il n'y a qu'une différence d'adaptation. On savait déjà qu'il est possible, dans certains cas, d'infecter les oiseaux avec le bacille humain et, inversement, d'obtenir un véritable bacille humain après plusieurs passages de bacille aviaire par le cobaye. On savait aussi que le bacille aviaire peut se rencontrer dans la tuberculose des mammifères (les cultures à type purement aviaire, employées jadis par M. Yersin, lors de ses recherches bien connues, provenaient du veau). On savait enfin que bien des cultures, isolées de l'organisme des oiseaux et surtout de l'organisme des mam-

mifères, présentent un mélange des caractères du b. aviaire et du b. humain.

Quant au b. pisciaire, il diffère infiniment plus des deux autres, que ceux-ci ne diffèrent entre eux. Certains auteurs auraient transformé les bacilles humain et aviaire en b. pisciaire, en passant par les animaux à sang froid (la grenouille, notamment); le fait a été sérieusement contesté.

III. *Diagnostic bactériologique de la tuberculose.*

Il peut se poser, chez l'homme ou chez les animaux, soit sur le vivant, soit sur le cadavre. Tantôt on a à sa disposition des produits pathologiques, tantôt il est impossible de s'en procurer. Dans le premier cas, le diagnostic se basera sur l'étude directe (examen microscopique, cultures, inoculations), dans le second cas, il faudra recourir à des moyens d'investigation indirects (tuberculinisation, séro-diagnostic).

Chez l'homme, on aura affaire, suivant les circonstances, à des crachats, des épanchements, du pus, de l'urine, des pièces provenant d'opérations chirurgicales ou d'autopsies, etc. Lorsqu'il s'agira d'établir un diagnostic chez les jeunes enfants, qui ne crachent pas (c'est-à-dire qui avalent leurs crachats), on devra aller recueillir les mucosités suspectes dans l'arrière-gorge, ou mieux encore extraire les crachats par le lavage de l'estomac pratiqué le matin, à jeun, quelques instants après la toux qui suit le réveil (Meunier). L'urine sera systématiquement centrifugée. On procédera de même pour les épanchements, sans attendre leur coagulation, surtout lorsqu'il s'agit d'en ensemencer le dépôt (Griffon).

Chez le bovidés, il ne faut pas compter sur le jetage, trop tardif; on pourra prélever les mucosités

dans le pharynx, à l'aide d'une éponge montée (Greffier), ou bien encore tirer la langue au dehors, faire tousser l'animal en pressant sur le larynx et recueillir le produit de l'expectoration ainsi provoquée.

Nous passerons maintenant en revue les divers moyens d'étude, mentionnés tout à l'heure.

Examen microscopique. — Grâce à ses réactions spéciales, le bacille de Koch sera bien rarement confondu avec d'autres organismes. Nous avons indiqué ailleurs comment on le reconnaît du b. lépreux ; nous mentionnerons plus loin le diagnostic différentiel avec certains pseudo-bacilles tuberculeux. S'il est en général aisé de reconnaître le b. de Koch, c'est à la condition toutefois qu'il ne soit pas trop rare dans les produits suspects. L'examen des crachats le montre généralement abondant (fig. 130), mais dans le pus, l'urine, les épanchements, il est souvent à l'état d'unités. En présence d'un résultat négatif, surtout si ce résultat se trouve en contradiction avec la clinique, on devra procéder à l'inoculation.



Fig. 130. — Bacilles tuberculeux dans un crachat.

Cultures. — M. Kitasato et divers auteurs après lui ont réussi à obtenir des cultures avec les crachats, en recueillant ceux-ci purement et en les ensemençant sur sérum glycériné, après de nombreux lavages, destinés à les débarrasser mécaniquement des organismes étrangers. Cette méthode a été indiquée ailleurs ; nous n'y reviendrons pas. MM. Bezançon et Griffon

préconisent l'emploi du sang gélosé glycériné, qui leur a permis de cultiver avec succès le dépôt des exsudats pleurétiques ; le développement du b. tuberculeux se fait en deux semaines, parfois moins. Enfin, M. Hesse a montré le parti que l'on peut tirer d'une matière albuminoïde spéciale « intermédiaire, dit-il, à l'albumine coagulée et à la somatose » que l'on appelle, du nom de son inventeur, *Nährstoff Heyden*. On ensemence les produits, en boîte de Petri, sur le milieu suivant :

Eau.	100
Glycérine.	10
Sel marin.	5
Nährstoff Heyden.	5
Gélose.	10

(Le milieu a été alcalinisé avec 5 centimètres cubes de solution normale de carbonate de soude).

L'examen microscopique des particules ensemencées permet de voir les bacilles se multiplier très rapidement (en quelques heures, affirment de nombreux auteurs). Si l'on reporte, sur sérum glycériné, ou même sur gélose glycérinée, les flocons qui ont montré une abondante prolifération de l'organisme tuberculeux, on obtient une culture visible, en 10 à 14 jours (Fränkel). Il faut, bien entendu, que ces flocons ne soient pas souillés d'impuretés. On s'adressera donc à des produits purs, ou à des crachats préalablement lavés, lorsque l'on désirera avoir des cultures proprement dites ; s'il s'agit simplement de provoquer un développement de germes, rares ou douteux, dans un but simplement diagnostique, on pourra parfaitement utiliser les produits impurs. D'autant qu'il semble bien démontré que le milieu de Hesse n'agit pas en favorisant spécialement la croissance du b. de Koch, mais en gênant celle des germes qui l'accompagnent (Jochmann, Römer, Fränkel).

La Nährstoff Heyden a été utilisée avec succès dans l'étude des dépôts urinaires (Bronstein).

Inoculations. — L'animal réactif est, avons-nous dit, le cobaye. S'il s'agit d'un produit pur, on l'inoculera dans le péritoine; l'animal sera sacrifié du 15e au 20e jour. S'il s'agit d'un produit impur, on l'inoculera sous la peau de la cuisse; les ganglions inguinaux se prendront du 10e au 12e jour; on pourra alors les ponctionner ou les extirper, pour chercher les bacilles. Lorsque les ganglions restent normaux, il faut sacrifier l'animal du 15e au 20e jour.

Tuberculinisation. — Rarement usitée chez l'homme. On peut toutefois y recourir, en usant de prudence, quand on a affaire à des sujets dont l'état général se montre satisfaisant. L'un de nous l'a vue employer bien souvent dans ces conditions par Quinquaud et cela sans aucun dommage. On commencera par 1 milligramme chez l'adulte, ou par un décimilligramme chez l'enfant. La tuberculine détermine une élévation thermique, qui atteint son acmé après 6 heures environ et qui disparaît ordinairement en une journée. Cette élévation thermique manque parfois dans les cas avancés. On peut la voir survenir après 12 heures seulement; on peut la voir aussi se prolonger pendant quelques jours; ce sont là des exceptions. La fièvre est accompagnée de phénomènes généraux (céphalalgie, vertiges, malaise), parfois sérieux (dyspnée, albuminurie) et même fort graves, si l'on s'adresse à des malades atteints de lésions étendues et si l'on injecte une trop forte dose de tuberculine. Localement, on observe, au niveau des lésions lupiques, une tuméfaction accompagnée de congestion violente — au niveau des tuberculoses chirurgicales, une réaction souvent très marquée — enfin, au niveau des poumons malades, une poussée inflammatoire, qui se traduit par des accidents parfois mortels.

La tuberculine rend les plus grands services dans le diagnostic de la *tuberculose des bovidés*. Elle détermine, chez les sujets malades, une élévation thermique caractéristique. Voici comment on doit l'employer. On prend la température des animaux, pendant 2 à 3 jours et l'on n'inocule que les sujets rentrés à l'étable depuis au moins 24 heures (car les variations atmosphériques peuvent donner de la fièvre et fausser les résultats). D'une façon générale, on n'injectera jamais les animaux fiévreux (c'est-à-dire offrant 39°,3 s'il s'agit d'adultes, 39°,8 s'il s'agit de jeunes sujets). On inoculera (autant que possible vers 6 heures du soir), derrière l'épaule, 2 à 4 centimètres cubes de tuberculine diluée, savoir :

Pour les taureaux ou bœufs de grande taille. .	4	cent. cubes.
Pour les vaches de grande taille.	3,5	—
Pour les vaches de taille moyenne.	3	—
Pour les animaux de 1 à 2 ans.	2	—

On prendra la température au moins 4 fois — 12, 15, 18, 21 heures après l'injection. Si la réaction thermique est supérieure à 1°,5, la tuberculose est certaine ; si elle est comprise entre 0°,8 et 1°,4, l'animal sera considéré comme suspect et on l'inoculera de nouveau après un mois. Enfin, une élévation thermique inférieure à 0°,8 n'a pas de signification. Il faut se souvenir que, chez les animaux très tuberculeux, la réaction peut être médiocre ou nulle.

Les sujets tuberculinés ne réagissent à une seconde inoculation qu'après un mois plein. Certains vétérinaires étrangers, peu scrupuleux, ont profité de cette circonstance pour tuberculiner les animaux malades, pendant les jours qui précèdent leur importation en France. MM. Roux et Nocard ont proposé, afin de détruire l'immunité transitoire ainsi créée, l'usage d'une tuberculine spéciale très active, à laquelle tout

sujet tuberculeux réagit (même s'il a récemment reçu de la tuberculine ordinaire).

Voici les doses auxquelles on emploiera la tuberculine *chez divers animaux* : cheval, 4 à 6 centimètres cubes ; — porc, 1-2 centimètres cubes ; — mouton et chèvre, 1/2 à 1 centimètre cube ; — chien et chat, 1/2 à 1 centimètre cube, selon la taille.

Sérodiagnostic. — Les opinions sont très partagées au sujet de la méthode de MM. Arloing et Courmont. Attaquée par MM. Beck et Rabinowitch, Dieudonné, Lubowsky, Neisser, Horcicka, elle a été défendue par MM. Mongour et Buard, Rothamel, Bendix. Elle peut s'appliquer aux hommes ou aux animaux (bovidés principalement). On ajoute le sérum du sujet à une culture homogène de 12 à 14 jours. Il faut faire plusieurs mélanges (1/5, 1/10, 1/20) et rechercher l'agglutination, non seulement à l'œil nu, mais encore au microscope. Le phénomène est moins rapide que dans le cas de la séro-réaction typhique ; toutefois, il convient de ne pas prolonger l'épreuve plus de 20 heures. On suivra la marche de l'agglutination, en regardant les tubes, qui contiennent les mélanges, au jour frisant et sur un fond noir. L'étude microscopique se fera sans recourir à l'immersion, pour ne pas noyer l'image dans une lumière trop vive. D'après MM. Arloing et Courmont, lors de tuberculose peu avancée, le pouvoir agglutinant du sérum est presque constant ; il varie de 1/5 à 1/20 (et au-dessus). Par contre, la réaction peut faire défaut ou demeurer peu marquée dans les formes graves ; il y aurait donc, jusqu'à un certain point, rapport inverse entre l'étendue des lésions et l'intensité de l'infection. Les sérosités pathologiques seraient douées d'un pouvoir agglomérant, analogue à celui du sérum sanguin. Notons enfin que le sérum des chèvres, inoculées à plusieurs reprises avec le b. de Koch, acquiert, d'après

MM. Arloing et Courmont, une faculté agglutinante très nette.

M. Romberg, sur le conseil de M. Behring, a substitué, aux cultures homogènes, certains *extraits de b. tuberculeux*. Ces extraits sont clarifiés, ou coagulés par le sérum des tuberculeux. Les résultats obtenus paraissent très intéressants, mais des documents nombreux seraient nécessaires pour porter un jugement définitif sur la méthode.

IV. *Pseudo-bacilles tuberculeux.*

Nous nommerons ainsi (pour les distinguer des bacilles pseudo-tuberculeux) un certain nombre d'organismes, décrits par les auteurs et simulant plus ou moins le bacille de Koch. La plupart n'ont qu'un intérêt scientifique, mais quelques-uns pourraient amener des erreurs de diagnostic. Nous les passerons successivement en revue, en indiquant leurs caractères essentiels.

Bacilles du lait et du beurre. — Ils seront décrits plus tard. (Voir Applications hygiéniques.)

Bacilles provenant de certains produits pathologiques. — Citons, à titre de curiosité, celui que M. Dietrich a isolé d'un kyste ovarique suppuré, et ceux que Mlle Rabinowitch a trouvés dans la gangrène pulmonaire et la bronchite putride.

Bacille du mucus nasal. — Il vient d'être étudié par M. Karlinski. C'est un organisme résistant aux acides, comme celui de Koch, mais n'offrant jamais de ramifications. Il est facile à cultiver. Sur gélose, il forme des colonies jaunâtres et sèches, qui deviennent ensuite plus foncées ; sur pomme de terre, on observe un dépôt grisâtre, filant ; sur gélatine, les caractères sont les mêmes que sur gélose (le milieu n'est pas liquéfié). En bouillon, il se produit un trouble, puis

un dépôt visqueux, jaunâtre. Le lait n'est pas modifié, bien que le microbe s'y développe. Toutes les cultures exhalent une odeur douce et désagréable à la fois. Le b. de Karlinski donne une pseudo-tuberculose du péritoine et des viscères abdominaux, quand on l'injecte dans l'abdomen du cobaye. Il n'est pas pathogène pour le lapin et la souris. Déposé sur la muqueuse nasale des animaux, il ne provoque aucun trouble ; de même chez l'homme, où il se multiplie cependant pendant 5 jours, à la surface de la pituitaire. L'étude de ce bacille serait peut-être mieux placée au chapitre « Lèpre », car *c'est surtout lors du diagnostic précoce de la lèpre*, par examen du mucus nasal, *que les erreurs seraient à craindre*. D'ailleurs, c'est précisément en cherchant à faire ce diagnostic précoce, que M. Karlinski a découvert le bacille qui vient d'être décrit.

Bacilles du smegma. — Souvent difficiles à distinguer du b. de Koch, par l'examen microscopique. M. Michaëlis prétend qu'ils se décolorent par les acides et par le Gram, mais non par l'alcool ; M. Casper affirme qu'ils résistent moins à l'alcool, mais autant aux acides que le b. tuberculeux ; la plupart des auteurs se déclarent incapables de faire le diagnostic histologique (Discussion à la Société de Médecine de Berlin, 1900). Les recherches de M. Neufeld sont venues apporter quelque lumière dans la question. Ce savant a montré qu'*il existe deux bacilles du smegma*. Le premier est aussi résistant aux acides que le b. de Koch. Il n'a pu être cultivé qu'une fois (sur gélose à l'urine et sur gélose-ascite) ; les colonies ne sont visibles qu'au microscope et le repiquage échoue. C'est bien le vrai bacille du smegma. Le second (bacille de Czaplewski et de Laser) pousse bien sur gélose au lait glycérinée ; il est peu résistant aux acides. C'est le b. pseudo-diphtérique de la peau, celui que

M. Ch. Nicolle a isolé si souvent jadis du chancre mou et dénommé bacillus cutis communis.

Bacilles de Möller. — Sous les noms de Mistbazillus (b. du fumier), Grasbazillus I ou Timothéepilz (b. de la fléole) et de Grasbazillus II ou Grasbazillus tout court (b. du gazon), M. Möller a décrit trois organismes curieux, qui ressemblent au b. de Koch et qui ont fait l'objet de plusieurs travaux. Nous devions, pour cette raison, ne pas les passer sous silence.

Le *Mistbazillus* résiste aux acides, offre des formes rameuses, pousse dans les milieux ordinaires et à la température ordinaire. Il paraît inoffensif pour les animaux et n'a pas été aussi complètement étudié que les deux autres.

Le *Timothéebazillus* ressemble tout à fait au b. de Koch et présente les mêmes réactions, en culture. Il pousse aisément, donnant des colonies orangées sur gélose ; le développement atteint son maximum en 2-3 jours à 37°, un peu plus tard à la température de la chambre. Le b. de la fléole, injecté seul dans le péritoine du lapin, de la souris, ou du cobaye, se montre inoffensif; mais, injecté avec du beurre ou du lait, il produit une péritonite exsudative ; en faisant des passages, on peut obtenir des lésions pseudo-tuberculeuses. Inoculé dans les veines du lapin, le Timothéebazillus détermine l'apparition d'une pseudo-tuberculose miliaire, qui offre toutefois une certaine tendance suppurative. Les nodules contiennent des follicules, au centre desquels se rencontrent des cellules géantes. Les bacilles y sont nombreux, mais ils ont perdu leur résistance à l'alcool et aux acides (Möller, Hölscher).

Le *Grasbazillus* est plus volumineux que le b. de Koch. Il donne des formes rameuses. Ses cultures sont jaunâtres, épaisses et tourmentées. Tous les

autres caractères, notamment les caractères d'inoculation, sont absolument identiques à ceux du b. de la fléole. Comme celui-ci, il n'est résistant aux acides (et à l'alcool) qu'en culture.

VERRUGA

Cette curieuse affection (que nous décrirons surtout d'après M. Odriozola) règne dans certaines vallées du Pérou. Elle serait *commune à l'homme et à plusieurs animaux* domestiques, notamment les solipèdes. Elle confère l'immunité lorsqu'elle guérit ; on peut donc espérer vacciner un jour contre elle.

La verruga offre deux types, aigu et chronique, en apparence bien distincts. L'identité de ces deux types a été démontrée par M. Carrion, dans une expérience, aussi courageuse que regrettable, pratiquée sur lui-même. Ce jeune savant, s'étant inoculé par simple piqûre, le sang d'un individu atteint de verruga chronique, succomba en 23 jours à la forme aiguë.

La *verruga aiguë* (ou fièvre de l'Oroya) se traduit, après 15-40 jours d'incubation, par des phénomènes généraux, accompagnés de douleurs dans les membres inférieurs ; puis, la fièvre s'allume, les douleurs deviennent très vives, le malade s'émacie rapidement et des hémorragies variées apparaissent. La rate et le système ganglionnaire se prennent, le sujet tombe dans le coma et meurt le plus souvent. Parfois cependant il guérit, après avoir présenté une éruption à peine marquée.

Dans la *verruga chronique,* les réactions générale et thermique restent modérées et l'éruption constitue le signe dominant de l'affection. Tantôt on observe des boutons miliaires, qui s'exfolient et saignent facilement ; ils débutent par les membres inférieurs, se

généralisent sous forme de poussées, ordinairement ascendantes et symétriques, atteignent les muqueuses et guérissent dans un certain nombre de cas. Tantôt ce sont des tumeurs volumineuses, siégeant principalement à la face, s'ulcérant et pouvant produire des hémorragies inquiétantes ; la guérison n'est toutefois pas exceptionnelle.

A l'*autopsie des cas aigus,* on ne trouve point de lésions viscérales bien caractéristiques ; à l'autopsie des cas chroniques, on rencontre une éruption de fines granulations au niveau du foie, de la rate, des poumons et des ganglions.

Dans les *lésions de la verruga chronique,* M. Ch. Nicolle a découvert un bacille, morphologiquement identique à celui de la tuberculose et se colorant comme lui par la méthode d'Ehrlich. Ce bacille est intra et extracellulaire ; les granulomes le contiennent en abondance. Ces granulomes sont constitués par des amas de cellules épithélioïdes, entourés de leucocytes (les cellules géantes n'ont été vues que, çà et là, dans le foie). M. Letulle a confirmé l'exactitude des données précédentes,

Le b. de la verruga n'a pu être cultivé jusqu'ici. M. Tamayo a inoculé un *chien* avec 1 centimètre cube de sang, provenant de la forme aiguë. Après 22 jours d'incubation, l'animal a présenté des phénomènes généraux graves, suivis de l'apparition d'une tumeur caractéristique à la patte droite ; le tout a guéri par la suite.

Comme on le voit, l'étude de la verruga offre le plus grand intérêt, mais elle est encore bien peu avancée.

PSEUDO-TUBERCULOSES EN GÉNÉRAL
PSEUDO-TUBERCULOSE COCCO-BACILLAIRE

I. *Pseudo-tuberculoses en général.*

On sait que, loin d'être spécifique, le tubercule doit être considéré simplement comme l'expression de la défense de l'organisme contre un parasite tenace mais modérément virulent. On ne saurait donc s'étonner que le b. de Koch ne soit pas le seul à provoquer la réaction phagocytaire spéciale, qui aboutit à la formation des granulomes. Les pseudo-tuberculoses sont extrêmement variées, ainsi que le montre la liste suivante :

1. *Pseudo-tuberculoses par substances inertes.*

Fils de soie, poudre de lycopode, etc.

2. *Pseudo-tuberculoses zooparasitaires.*

Larves de nématodes, rencontrées dans les reins du chien et dans les poumons du chat (Ebstein et Nicolaïer). Œufs de strongylus filaria, trouvés dans les poumons du chien (Laulanié), etc...,

3. *Pseudo-tuberculoses microbiennes.*

a) Dues aux moisissures. — Aspergillose, mycoses diverses.

b) Dues aux levures. — Oïdiose, lymphangite épizootique, etc.

c) Dues aux streptothrix. — Actinomycose, farcin du bœuf, etc.

d) Dues aux bactéries. — Morve chronique ; peste expérimentale chronique ; certaines pasteurelloses chroniques ; affections dues au bacille de Preisz-Nocard ; granulomes humains occasionnés par les bacilles de Manfredi, Hayem, du Cazal et Vaillard ; maladie de Malassez et Vignal (ou pseudo-tuberculose cocco-bacillaire), etc.

Nous n'étudierons ici que la pseudo-tuberculose cocco-bacillaire.

II. *Pseudo-tuberculose cocco-bacillaire.*

Découvert par MM. Malassez et Vignal dans un nodule tuberculeux sous-cutané (que portait, à l'avant-bras, un enfant de 4 ans, mort de méningite tuberculeuse), le bacille de la tuberculose zoogléique a été retrouvé ensuite dans des circonstances très variées. On l'a isolé de l'air (Chantemesse), du sol (Grancher et Ledoux-Lebard), du lait (Parietti). M. Masselin l'a rencontré dans des crachats et M. Carré dans des angines infantiles (soit seul, soit associé au b. de Löffler). Il a été mis en cause dans des affections épidémiques de la poule (Nocard), du cobaye (Charrin et Roger, Zagari, Delbanco), du lapin (Eberth, Dor, Nocard), du cheval (Pfeiffer), de la vache (Nocard, Masselin, Lignières). D'après M. Preisz, tous ces microbes sont vraisemblablement identiques ; certains le sont certainement.

A. Principaux caractères du cocco-bacille.

Caractères morphologiques.

Dans les nodules tuberculeux (par exemple ceux du cobaye), on rencontre des amas fortement colorés et constitués par des zooglées de microcoques ovoïdes, ou par de courts bacilles, disposés en séries longitu-

dinales et formant des chaînettes qu'agglomère une substance visqueuse. Dans les cultures (fig. 131), le microbe est très polymorphe. Il forme tantôt des amas zoogléiques, tantôt des chaînettes et peut aussi se présenter isolé, avec des dimensions plus ou moins grandes. Il ne prend pas le Gram et sera coloré de préférence avec la thionine phéniquée ; parfois il montrera un aspect en navette.

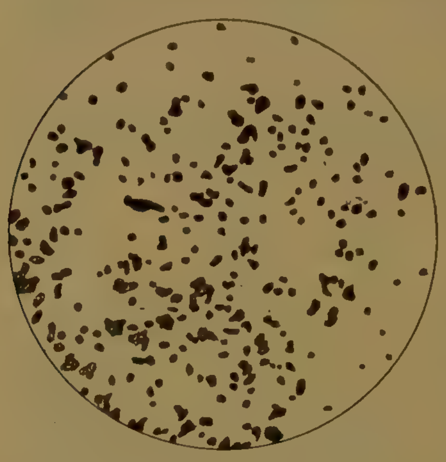


Fig. 131. — Cocco-bacille de Malassez et Vignal (culture).

Caractères de culture.

Le bouillon se trouble rapidement et une pellicule se forme à sa surface. Plus tard, la culture tombe au fond du tube et le liquide s'éclaircit. En strie, sur la gélatine, apparaît une couche peu épaisse, légèrement adhérente au milieu ; en piqûre, l'aspect est celui d'un clou, dont la tête seule est bien développée ; en plaques, les colonies prennent l'aspect de gouttes de cire blanche ; la gélatine n'est pas liquéfiée. Sur gélose, simple ou glycérinée, le développement se montre abondant ; c'est une nappe blanchâtre ou légèrement jaunâtre ; dans les vieilles cultures, on voit souvent apparaître, au sein du milieu, des cristaux de phosphate de chaux qui irradient profondément et, à la surface, de nombreuses irisations. Les cultures dégagent une odeur désagréable. Sur sérum, mêmes caractères que sur gélose. Sur pomme de terre,

on observe un dépôt blanc jaunâtre, qui brunit ensuite et finit par ressembler à celui que donne le bacille de la morve.

Caractères biologiques.

La température de 20° est plus favorable à la croissance et à la longue conservation que la température de l'étuve. Celle-ci ne permet la vie du microbe que pendant 4 à 5 semaines. Le cocco-bacille de Malassez et Vignal aime les milieux glycérinés. Il ne coagule pas le lait. Il ne fait pas fermenter le lactose. Pour la majorité des auteurs il ne pousserait qu'au contact de l'air.

Caractères d'inoculation.

Les animaux de choix sont le cobaye et le lapin. L'inoculation intra-abdominale fait mourir le cobaye en 4 à 7 jours ; on constate, à l'autopsie, un épanchement péritonéal ; l'épiploon est rétracté ; il existe des tubercules miliaires dans le foie et dans la rate ; les lésions pulmonaires s'observent très rarement. Lorsque l'injection a été faite sous la peau, il se produit une ulcération locale ; les ganglions correspondants s'engorgent ; la mort survient du 8e au 15e jour ; à l'autopsie, les ganglions tuméfiés se montrent caséeux ; on trouve aussi des granulations grisâtres sur le péritoine et dans les viscères. MM. Delbanco et Lignières ont montré que les cobayes étaient tués facilement par ingestion et par cohabitation ; par ingestion, on obtient une pseudo-tuberculose intestinale et généralisée.

Une culture récente, injectée dans les veines du lapin, le tue en 1 à 4 jours, avec une simple hypertrophie du foie et de la rate. Une culture plus ancienne, vieille de 20 jours par exemple, tue en 2 à 3 semaines, avec une pseudo-tuberculose généralisée ;

on observe alors, à l'autopsie, tous les degrés entre la tuberculose miliaire et la tuberculose caséeuse. L'inoculation intrapéritonéale amène la mort en 4 ou 5 jours; on constate la présence de tubercules miliaires dans le foie et la rate. L'affection qui succède à l'inoculation sous-cutanée peut être de très longue durée ; tout peut même se borner à un nodule qui guérit.

La souris est sensible à certains virus, insensible à d'autres. Renforcé par quelques passages chez le lapin, le cocco-bacille de Malassez et Vignal peut tuer le chien, le chat, le mouton, la poule et le pigeon, par inoculation intraveineuse (Lignières).

B. Diagnostic de la pseudo-tuberculose cocco-bacillaire.

La pseudo-tuberculose zoogléique est rarement observée *chez l'homme* (Malassez et Vignal, Carré). Aussi, est-ce surtout *chez les animaux et à l'autopsie,* que se pose la question du diagnostic. Celui-ci, macroscopiquement très difficile, sera aisément établi par l'examen microscopique, la culture et les inoculations. Traitées par la méthode d'Ehrlich, les coupes des organes « pseudo-tuberculeux » ne montreront aucun bacille de Koch ; colorées à la thionine, elles feront voir, au contraire, au sein des granulomes, des zooglées vraies ou des microbes

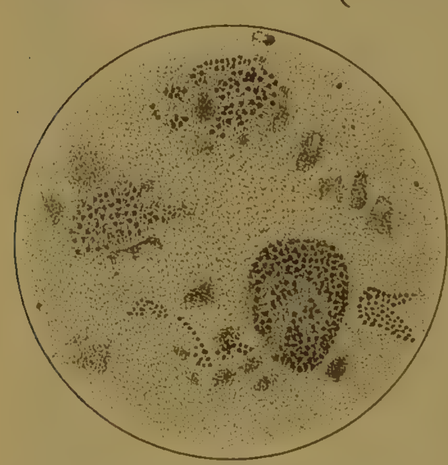


Fig. 132, — Tuberculose zoogléique (poumon de poule) d'après Thoinot.

soit isolés, soit en courtes chaînettes. Ces bacilles seront d'ailleurs souvent difficiles à discerner, noyés qu'ils sont dans des débris cellulaires fortement teintés ; on les cherchera de préférence à la périphérie des nodules (fig. 132). Les ensemencements, au lieu de fournir un résultat négatif comme lors de tuberculose vraie, donneront, dès le lendemain, dans les divers milieux, des cultures abondantes. Enfin, l'inoculation des tubercules et surtout des cultures, provoquera une maladie, dont la rapidité d'évolution contraste avec la marche lente de la tuberculose vraie.

PSITTACOSE

La psittacose est une maladie *commune aux psittacées* (perruches, perroquets) *et à l'homme*. L'agent pathogène de cette affection a été découvert, en 1892, par M. Nocard, dans la moelle des os de perruches venues de Buenos-Ayres, perruches qui avaient occasionné une épidémie de pneumonie. Une épidémie analogue se manifesta à Florence en 1895 ; le micro-organisme de Nocard y fut retrouvé par M. Palamidessi. Enfin, MM. Gilbert et Fournier ont rencontré le bacille pathogène dans le sang de perroquets malades et dans le sang du cœur d'une personne ayant succombé à l'affection.

Le *bacille de la psittacose* est intermédiaire au colibacille et au bacille d'Eberth. Il est très mobile et possède de 10 à 12 cils. Ses caractères de culture le rapprochent plutôt du b. coli que du b. d'Eberth. Par contre, il ne fait pas fermenter les sucres, il ne coagule pas le lait et ne produit pas d'indol ; il correspond donc au type n° 5 de notre tableau des colibacilles (formule — — — +). Il pousse plus lentement que le b. coli sur le milieu d'Elsner et sur la gélose grattée, où s'est développé le b. typhique (ce dernier ne pousse pas sur la gélose grattée, où a végété le b. de la psittacose). Le microbe de Nocard se développe concurremment au b. coli dans le bouillon. Il n'est pas influencé par le typhussérum ; le sang des malades atteints de psittacose n'agglutine pas davantage le b. d'Eberth.

Le b. de la psittacose est inoculable aux perruches et aux perroquets, par ingestion et par inhalation (le b. typhique, au contraire, ne tue pas ces animaux). Dans les deux cas, on observe de la somnolence, de la diarrhée, du hérissement des plumes. La mort survient au bout de 3 à 5 jours. A l'autopsie, on trouve une congestion générale des viscères, des ulcérations intestinales et une hypertrophie, souvent très marquée, de la rate. Le bacille s'isole facilement, soit du sang, soit des divers organes. Inoculé sous la peau, il tue la souris, le pigeon, la poule. Il est moins virulent pour le cobaye et le lapin.

Le *diagnostic* de psittacose peut se poser dans deux conditions : *chez les animaux* et *chez l'homme*. Les animaux seront sacrifiés et le bacille pathogène recherché à l'aide d'ensemencements de la rate et du sang du cœur. On s'attachera à le différencier du b. typhique et du b. d'Eberth, par les caractères énoncés plus haut. Même dans le cas où les animaux sont morts depuis un temps fort long, l'examen bactériologique peut permettre de déterminer la nature de la maladie. C'est dans la moelle des os, des ailes desséchées depuis quatre mois, que M. Nocard a trouvé pour la première fois le b. de la psittacose. — Chez l'homme, ce bacille sera recherché, *pendant la vie,* dans le sang et les crachats, bien qu'il n'y ait pas encore été rencontré. *A l'autopsie,* on l'isolera du sang du cœur (comme l'ont fait MM. Gilbert et Fournier) ou de la moelle des os. Le sérodiagnostic devra toujours être pratiqué ; il a parfois donné des résultats positifs (Ch. Nicolle).

La *prophylaxie* de la maladie n'est pas à négliger. De 1892 à 1897, on n'en a pas compté en effet moins de 70 cas, qui ont donné lieu à 24 décès. La contagion paraît se faire surtout par les déjections, mais elle ne se réalise pas uniquement par ce procédé. En

effet, des perruches placées dans une cage, avec des ailes desséchées, d'oiseaux qui ont succombé à la maladie, ne tardent pas à mourir elles-mêmes. L'importation et la vente des oiseaux exotiques demandent donc à être surveillées de très près.

GÉNÉRALITÉS SUR LES STREPTOTHRIX. — ACTINOMYCOSE.

A. *Généralités sur les streptothrix.*

Le *rôle des streptothrix,* dans la pathologie humaine ou animale apparaît de jour en jour plus *important.* Il est donc nécessaire que le bactériologue n'ignore point les caractères auxquels on reconnaît cette famille de microbes. Les streptothrix ont été décrits pour la première fois, en 1873, par Cohn, qui fit connaître le s. Försteri, isolé d'une concrétion du canal lacrymal de l'homme. Ce sont des *filaments ramifiés* (fig. 133), présentant fréquemment, quand on les étudie sans coloration, des alternances de points clairs et de points obscurs. Ils se colorent par la méthode de Gram. MM. Sauvageau et Radais les font rentrer dans le genre *oospora* (hyphomycètes). Étudiant des cultures de diverses espèces, sur milieux liquides ou solides, ils ont vu celles-ci se recouvrir d'un fin semis, blanc puis jaunâtre, constitué par l'accumulation de *spores* en chapelet. Ils ont suivi, en goutte pendante, la ger-



Fig. 133. — Streptothrix.

mination de ces spores et noté qu'elles donnaient naissance à deux ordres de ramifications, les unes stériles, les autres sporifères. Ces dernières forment, par étranglement, après quelques jours, des chapelets de spores. Les streptothricées se distinguent des autres hyphomycètes du genre oospora, par l'*absence de cloisonnement du mycélium*.

Les milieux liquides ne sont pas troublés par le développement de ces organismes. Ils y donnent des flocons et des voiles. Sur les milieux solides, apparaissent des colonies saillantes, bombées, plissées ou verruqueuses, qui durcissent par la dessiccation et adhèrent fortement au milieu. Elles sont toujours très difficiles à dissocier. Les streptothricées aiment les milieux glycérinés et amylacés. La plupart sont chromogènes, mais la couleur varie plus ou moins dans chaque espèce. L'optimum de développement est 37°-38°, au moins pour les types pathogènes.

L'*habitat* des oospora est très divers. On les a rencontrées dans l'eau (s. violacea), dans l'air (s. albidoflava, s. carnea, s. aurantiaca), dans le sol (s. Gruberi), dans l'organisme [dans des concrétions du canal lacrymal, chez l'homme ; sur la peau de l'homme, du lapin et de la génisse. Le streptothrix de la peau des génisses se retrouve très fréquemment dans le vaccin, comme l'ont montré MM. Sabrazès et Joly]. Un grand nombre d'espèces sont pathogènes et traduisent leur présence dans l'organisme par la production de lésions pseudo-tuberculeuses. L'actinomyces va nous en fournir un exemple typique.

B. *Actinomycose*.

I. Principaux caractères de l'actinomyces.

Caractères morphologiques.

On sait que chez l'homme, comme chez les animaux

(bovidés, porc, cheval), les lésions de l'actinomycose consistent tantôt en abcès, tantôt en tumeurs d'aspect plus ou moins sarcomateux. Le pus des abcès présente, en général, des caractères macroscopiques qui permettent d'en reconnaître la nature ; on y trouve de petits *grains jaunes*, opaques, onctueux au toucher, dont le volume varie entre celui d'une tête d'épingle et celui d'un grain de millet. Ces grains, habituellement d'un jaune d'or, peuvent être blanchâtres et transparents ; parfois aussi ils sont verts, ou même noirs. En écrasant un grain jaune entre lame et lamelle, on constate qu'il est constitué par un agrégat de grains plus petits, élémentaires. Ceux-ci présentent une partie centrale, formée d'un réseau de fibrilles assez volumineuses, intimement intriquées et une partie périphérique, dans laquelle ces fibrilles s'irradient en tous sens, se terminant par des *renflements en massue*. Chaque grain élémentaire correspond à une cellule de streptothrix. Les renflements en massue peuvent manquer dans les granulations transparentes ; on ne constate alors qu'un ensemble de divisions rameuses, de calibre égal dans toute leur étendue. Le parasite peut être reconnu avec un faible grossissement et sans coloration. Dans les vieux grains, les fibrilles sont confondues en une masse amorphe, vitreuse et les massues seules demeurent distinctes. L'actinomyces pré-

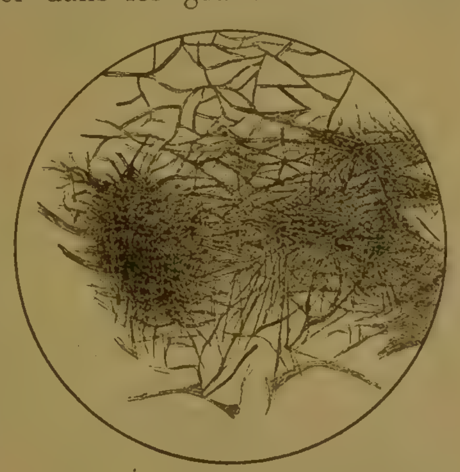


FIG. 134. — Actinomyces. Culture en bouillon.

sente dans les tissus un aspect analogue à celui qu'il revêt dans le pus. Dans les cultures (fig. 134), il se montre extrêmement polymorphe. Suivant leur âge, les cellules se présentent comme des bacilles courts ou longs, ou comme des ramuscules plus ou moins compliqués ; les formes en massue font constamment défaut. Enfin, on trouve, à côté des filaments ramifiés, des corps arrondis qui représentent des *arthrospores*.

Les grains peuvent être colorés par le picro-carmin. Le parasite prend une teinte jaune, tandis que les cellules qui l'entourent se colorent en rouge. L'actinomyces se teinte facilement avec les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram.

Caractères de culture.

Les cultures de l'actinomyces sont plus difficiles à obtenir avec les lésions de provenance humaine qu'avec les lésions bovines. Dans le bouillon glycériné, il se produit de petits flocons arrondis, qui se rassemblent au fond du tube sans troubler le liquide. Ces masses sont parfois réunies par une matière glutineuse, surtout dans les vieilles cultures. A la surface, apparaît plus ou moins tardivement un voile discontinu, débutant près de la paroi du vase et formé de colonies isolées, arrondies et d'un aspect gras. On les a comparées à des feuilles de nénuphar flottant sur l'eau et mieux encore à des îlots de graisse figée recouvrant du bouillon. L'actinomyces pousse dans le bouillon simple, mais moins abondamment.

Sur la gélose glycérinée, apparaissent, après quelques jours, des corps arrondis, saillants, secs, arrivant à se réunir si l'ensemencement est abondant et formant alors une couche qui ressemble à un amas de lichens. La teinte des colonies, d'abord grisâtre, devient ensuite jaunâtre, puis vert bronze et finalement presque noire. La masse se recouvre peu à peu d'une

poussière de spores jaunes, comme si on l'avait saupoudrée de fleurs de soufre. Parallèlement, la gélose brunit et prend une couleur de caramel. Sur gélose simple, l'aspect est à peu près identique.

Sur sérum, on observe le développement de masses blanches, devenant plus tard jaunes ou rougeâtres. En gélatine, les colonies offrent un aspect rameux ; le milieu se liquéfie lentement. L'actinomyces se développe fort bien sur pomme de terre glycérinée, où il forme une couche épaisse, plissée, qui évolue comme la couche développée sur gélose. On peut aussi cultiver l'actinomyces sur pomme de terre ordinaire. Par contre, il ne pousse pas dans l'infusion de foin, de chou, de navet ou de carotte.

Quoique très aérobie, il est susceptible de se développer dans le vide, ainsi que le fait a été observé par M. Vincent. Notons encore qu'il peut se cultiver sur des grains de blé et d'avoine. Il y conserve sa vitalité pendant très longtemps. Le grain se recouvre d'un enduit pulvérulent jaunâtre, formé par les spores ; celles-ci, ensemencées après 3 ans, ont encore donné des cultures typiques (Bérard).

Caractères d'inoculation.

M. Johne aurait reproduit l'affection chez la génisse. Après lui, MM. Wolff et Israël ont obtenu des nodules péritonéaux chez le cobaye et le lapin. M. Wolff a rapporté l'histoire d'un cobaye qui, inoculé dans le péritoine, mourut après un an et demi. A l'autopsie, on constata, dans la séreuse et dans le foie, la présence de tumeurs actinomycosiques typiques. Le parasite fut retrouvé sur les coupes et les ensemencements fournirent un résultat positif. Plus récemment, MM. Ponfick, Dor et Bérard disent avoir obtenu des résultats positifs, en inoculant à des cobayes et à des lapins du pus d'actinomycose humaine. A l'autopsie,

on trouvait des tumeurs actinomycosiques dans le péritoine, l'épiploon et le mésentère.

II. Diagnostic bactériologique de l'actinomycose.

Il ne présente pas de grandes difficultés et l'on pourra, souvent, se dispenser de recourir aux cultures. Les grains suspects, contenus dans le pus, seront écrasés entre lame et lamelle et examinés au microscope. Pour débarrasser le parasite des éléments cellulaires voisins, on fera agir la potasse à 3 pour 100 ou l'acide acétique dilué ; on montera ensuite dans la glycérine. On pourra aussi colorer extemporanément par le picro-carmin. De toute façon, l'aspect est si caractéristique qu'il ne prête guère à confusion. Il arrive parfois qu'on ne rencontre pas de grains jaunes dans le pus. MM. Lemière et Becue recommandent alors le procédé suivant : 1° étaler le pus sur la lame ; dessécher et laver à l'éther ; 2° faire agir quelques minutes une solution de soude à 30 pour 100 ; 3° colorer pendant 15 minutes dans une solution aqueuse d'éosine à 5 pour 100 ; 4° laver avec une solution aqueuse saturée d'acétate de soude et examiner dans cette solution. La masse centrale des amas d'actinomyces se colore en rouge ; les massues sont teintées en rose-jaunâtre pâle. Les coupes de tumeurs actinomycosiques, ou soupçonnées telles, seront traitées par la méthode de Gram ou par les divers procédés indiqués au début de cet ouvrage.

III. Traitement de l'actinomycose.

On sait que, depuis les travaux de M. Thomassen, confirmés par M. Nocard, le *traitement par l'iodure de potassium* s'est généralisé en *pathologie bovine*. On administre, par les voies digestives, 6-12 grammes de

KI par jour, pendant deux semaines en moyenne. Puis, l'animal est laissé au repos et si la résolution des lésions prend une allure trop lente, on recommence le traitement pendant quelques jours. MM. Nocard et Leclainche rejettent comme inutile toute intervention locale.

En *pathologie humaine*, la méthode de Thomassen donne de bons résultats, surtout au début de l'affection et dans les formes bénignes. Dans les cas anciens ou malins, MM. Poncet et Bérard recommandent de ne pas s'en tenir au traitement médical et d'intervenir chirurgicalement.

BOTRYOMYCOSE

I. *Principaux caractères du botryocoque.*

Caractères morphologiques.

La botryomycose est une affection commune à l'homme et aux animaux. Chez le *cheval*, le botryocoque (que nous décrirons d'après MM. Poncet et Dor) occasionne des lésions assez variées, dont la plus connue est la tumeur pédiculée qui se développe à l'extrémité du cordon testiculaire, après la castration et qu'on désigne pour cette raison sous le nom de « champignon de castration ». Le botryocoque se rencontre aussi dans des néoplasmes fibreux, qui peuvent siéger en différents points des téguments, particulièrement à la mamelle et dans des foyers de suppuration très analogues à ceux de l'actinomycose, où il donne lieu à la formation de grains jaunes, également semblables à ceux de l'actinomyces. Il se trouve plus rarement chez les *bovidés* (dans la mamelle : 1 cas) et chez le *porc* (à la suite de la castration : 1 cas). Chez l'*homme*, le botryocoque produit des tumeurs papillomateuses pédiculées « framboesiformes », qui ressemblent beaucoup au champignon

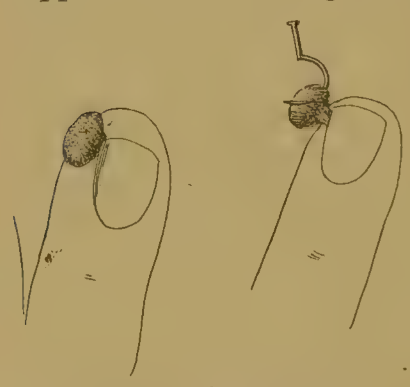
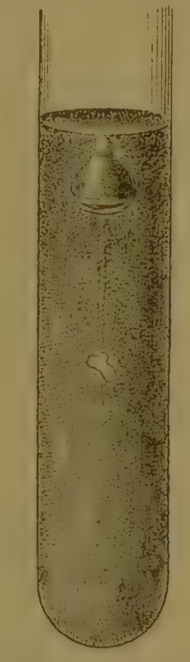


Fig. 135. — Botryomycose.

de castration. Leur volume varie de celui d'un pois à celui d'une noix. Elles siègent de préférence à la main et aux doigts (fig. 135). Chez l'homme, comme chez l'animal, il s'agit d'une néoplasie inflammatoire et non d'une tumeur vraie. La méthode des coupes permet d'y déceler la présence caractéristique de micrococques en colonies primaires, réunies elles-mêmes en colonies secondaires, mûriformes et jaunâtres. Chaque colonie primaire est entourée d'une capsule hyaline qui, contrairement au parasite, ne se colore pas par le bleu de méthylène.

Dans les cultures, le botryocoque présente l'aspect du staphylocoque, avec lequel, si l'on s'en tenait aux caractères morphologiques, il serait impossible de ne pas le confondre. Les coccus sont 100 fois plus petits que dans les grains jaunes. Ils se colorent par toutes les couleurs basiques d'aniline et prennent le Gram.


Fig. 136. — Culture de botryomyces en gélatine, d'après Poncet et Dor.

Caractères de culture.

Les cultures par piqûre en gélatine ont une apparence tout à fait spéciale (fig. 136). Il se forme d'abord une traînée gris blanchâtre, qui grossit peu à peu ; puis, naît à la partie supérieure de la traînée une bulle en forme de tulipe ou de calice, qui augmente insensiblement de volume. La gélatine se liquéfie dans le voisinage immédiat de la traînée blanchâtre, qui se disloque et présente à un moment donné l'apparence d'une ligne légèrement ondulée. Ensuite, les sinuosités s'accentuent et finissent par ressembler à une

hélice. A la partie inférieure de la piqûre, on voit se condenser de petits amas jaunâtres et très fins, dont le nombre augmente peu à peu. Enfin, le filament s'écroule tout entier sous l'aspect d'une masse informe à la partie inférieure de la piqûre. Cette masse reste reliée à la « tulipe » supérieure par un cylindre de gélatine liquéfiée, qui se dessèchera dans la suite et où nagent des amas de microcoques, ténus comme une poussière. A la partie supérieure, se produit une pellicule. En boîtes de Petri, on voit apparaître des colonies arrondies, d'abord d'un gris argenté, puis d'un gris jaunâtre et toujours pourvues d'un reflet métallique. Lorsque la gélatine est liquéfiée (ce qui survient si les cultures ont poussé à la surface des plaques et non dans leur profondeur), il semble que l'on ait saupoudré le millieu de pollen. Le pouvoir liquéfiant est plus faible que celui du staphylocoque.

Sur pomme de terre, le botryocoque croît sous la forme d'un enduit jaunâtre, peu caractéristique. Sur gélose et à une température de 20° à 30°, il donne lieu à des colonies orangées, qui deviennent blanches quand les tubes sont transportés à 37°. Le botryocoque produit également des colonies blanches d'emblée sur la gélose, à la température de l'étuve. Par conséquent le pigment ne se forme pas ou est détruit à 37°. Les cultures en bouillon et sur sérum coagulé ressemblent à celles de l'aureus. Le botryocoque coagule le lait. Dans tous les milieux de culture, il dégage une « odeur rafraîchissante », une « odeur de fraise », très spéciale. Les grains jaunes n'apparaissent jamais en dehors de l'organisme (Poncet et Dor).

Caractères d'inoculation.

L'inoculation des cultures au cheval ou à l'âne détermine l'apparition, tantôt de suppurations

grains jaunes, tantôt de néoplasies tout à fait analogues au champignon de castration ou aux tumeurs pédiculées de la main de l'homme. Cette constatation suffit à distinguer complètement le microbe du staphylocoque et à affirmer sa spécificité. Le staphylocoque, inoculé au cheval, ne donne jamais de grains jaunes dans le pus et ne produit jamais de néoplasies. Chez les animaux de laboratoire, l'expérimentation ne provoque aucune altération caractéristique. Les symptômes et les lésions observées ne diffèrent pas de ceux qu'on obtient avec le staphylocoque. (Poncet et Dor).

II. *Diagnostic bactériologique de la botryomycose.*

Chez l'homme, le diagnostic des tumeurs botryo-

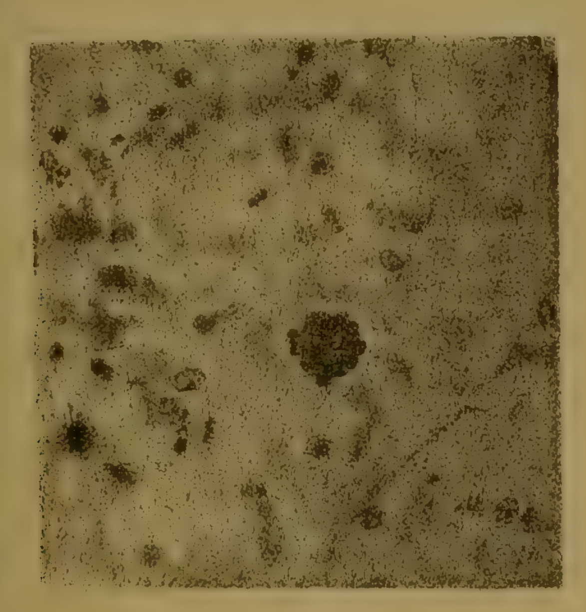


Fig. 137. — Botryomyces

mycosiques se pose avec des tumeurs inflammatoires

vulgaires, simples bourgeons charnus exubérants et pédiculés. On cautérisera un point de la tumeur ; on introduira à travers l'escarre l'extrémité d'une pipette flambée ; on aspirera un peu de sérosité sanguinolente et on fera des ensemencements en bouillon et, par piqûre, en gélatine. On pratiquera aussi avec avantage des inoculations sous la peau de l'âne ou du cheval. La tumeur étant enlevée, on la fera durcir et on la débitera en coupes, dans lesquelles on recherchera les amas mûriformes caractéristiques.

Chez l'animal et en présence de la forme néoplasique, on se comportera de façon identique. En présence d'une suppuration à grains jaunes, le diagnostic différentiel se posera avec une suppuration actinomycosique. Les grains seront examinés entre lame et lamelle, sans coloration ; l'aspect muriforme des grains à botryocoque (fig. 137) sera aisément distingué de l'aspect rayonné de grains actinomycosiques.

III. *Traitement de la botryomycose chez le cheval.*

M. Thomassen fait prendre aux animaux 10 grammes d'*iodure de potassium* par jour, pendant 15 jours ; on abaisse ensuite à 6 grammes dans le cas d'iodisme. Les résultats seraient souvent efficaces et des champignons de castration volumineux pourraient rétrocéder en un mois.

PSEUDO-TUBERCULOSE ASPERGILLAIRE (ASPERGILLOSE)

Chez l'homme, l'aspergillus fumigatus est susceptible d'envahir l'appareil respiratoire (aspergillose pulmonaire primitive des gaveurs de pigeons, des peigneurs de cheveux..., etc. ; aspergillose pulmonaire secondaire), le rein, la peau, la cornée, le naso-pharynx, l'oreille..., etc. Chez les oiseaux et les mammifères, il détermine des affections (naturelles) bronchiques, pulmonaires ou péritonéales et même des maladies générales, très analogues aux septicémies hémorragiques. Enfin, l'aspergillus fumigatus envahit fréquemment les œufs en incubation (Lucet).

I. *Principaux caractères de l'aspergillus fumigatus.*

Caractères morphologiques.

L'a. fumigatus est constitué à l'état adulte par un mycélium, qui donne des rameaux stériles et des rameaux sporifères. Les spores sont petites, de 3 à 4 μ de diamètre, circulaires, complètement lisses. L'évolution totale (de la spore à la spore), en liquide Raulin, se fait en 22 heures environ à 24°.

L'aspergillus se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline ; la thionine convient tout particulièrement. Il prend le Gram à chaud.

Caractères de culture.

Les milieux habituels sont peu favorables au développement du champignon. En bouillon peptonisé alcalin, il n'arrive pas jusqu'à fructification. Sur gélatine, les spores ne se développent qu'en 2 ou 3 semaines ; la gélatine est liquéfiée à la longue. Sur gélose ordinaire, le mycélium est visible au bout de 30 heures. Les spores n'apparaissent que le 3e jour; elles sont d'abord enfumées, puis prennent un ton noir après 5 jours. Les milieux acides, au contraire, et en particulier le liquide Raulin, se montrent excellents. Sur ce dernier, on voit le mycélium se développer en 5 à 12 heures, les spores en 12 à 15 heures. La surface des colonies prend d'abord l'aspect d'un tapis velouté blanc, qui devient vert bleuâtre, puis vert foncé et finalement brun noirâtre, au bout de 5 à 6 jours. Sur gélose au liquide Raulin, la croissance est également très rapide et les spores offrent en 4 jours un ton franchement noirâtre. Comme milieux favorables on peut encore citer : les milieux glycérinés glucosés, le moût de bière (sur lequel le développement atteint son maximum), la pomme de terre, le pain humide, le lait (l'aspergillus le coagule), l'urine, etc.

Caractères biologiques.

La température la plus convenable est voisine de 37° à 38°; on peut même aller jusqu'à 40°. La croissance se fait mal entre 55° et 60°. Elle n'a pas lieu au-dessous de 20°. Elle est d'autant plus riche que la culture est plus aérée. Après culture, les milieux alcalins conservent leur réaction ; les milieux acides deviennent neutres et parfois alcalins. La couleur des

spores varie suivant la réaction : verdâtres en milieux acides, elles se montrent brun noirâtre sur les milieux neutres ou alcalins. M. Rénon, dans des conditions bien déterminées de température et d'absence d'air, a vu les spores prendre une coloration jaunâtre, qui rapprochait l'aspergillus fumigatus de l'aspergillus flavus. Réensemencées au contact de l'air, les unes donnèrent des spores vertes, les autres des spores jaunes. Les spores de l'aspergillus fumigatus sont très résistantes au vieillissement ; on les trouve encore vivantes au bout de 4 ans (Rénon). Elles résistent longtemps aussi aux basses températures, à une chaleur modérée (au-dessous de 57°), et à de nombreux agents chimiques.

Caractères d'inoculation.

Ce sont les oiseaux et particulièrement le pigeon, qui se montrent les plus susceptibles de contracter expérimentalement l'aspergillose. Parmi les mammifères, il faut citer le singe et, comme animaux de laboratoire, le lapin et le cobaye. Le chat et le chien sont réfractaires.

L'inoculation dans la veine axillaire du pigeon est suivie d'une mort plus ou moins rapide. Elle se produit parfois au bout de 2 jours. A l'autopsie, c'est surtout (et quelquefois uniquement) le foie qui est atteint. Les pigeons peuvent également être infectés par inhalation, par ingestion, par injection dans le tissu sous-cutané ou le muscle pectoral, la plèvre, le péritoine..., etc. Le lapin et le cobaye, inoculés dans les veines, meurent au bout de 5 à 10 jours. A l'autopsie, les lésions rénales prédominent. Chez le singe, on observe, après inoculation dans la trachée, des lésions de pseudo-tuberculose pulmonaire.

Quel que soit, du reste, l'appareil intéressé, l'affec-

tion se présente toujours sous forme nodulaire. Les granulations contiennent un feutrage de filaments mycéliens ; on y observe la présence de cellules géantes et de cellules épithélioïdes. La caséification est fréquente. Parfois aussi, comme M. Rénon l'a montré pour le rein, il se produit un processus très actif de sclérose qui aboutit à la guérison.

M. Levaditi a inoculé l'aspergillus fumigatus dans le cerveau du lapin. La durée de l'affection est proportionnelle à l'âge des cultures. A l'autopsie, on observe des nodules qui ressemblent beaucoup à ceux de l'actinomycose.

II. *Diagnostic bactériologique de l'aspergillose.*

C'est surtout dans les crachats que l'on aura à rechercher l'aspergillus. Ceux-ci seront étalés sur une lame et, après dessiccation, colorés à la thionine. On ne prendra pas, pour le mycelium aspergillaire, les champignons décrits dans les crachats tuberculeux par M. Coppen Jones et qui se développent autour des fibres élastiques. Afin d'éviter toute cause d'erreur, on fera une culture en liquide Raulin. Ce liquide ayant été réparti et stérilisé, on ensemencera une parcelle de crachats qui tombera au fond du tube et on portera à l'étuve à 37°. Dès le 2e jour, on voit le mycélium monter à la surface et former un tapis velouté, blanchâtre. Après 20 heures, ce tapis se recouvre de spores verdâtres, qui plus tard prennent une couleur enfumée. On injectera aussi des spores (diluées dans du bouillon) dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin. L'animal succombera en 5 à 10 jours à une pseudo-tuberculose généralisée, prédominante au niveau du rein. Un fragment de cet organe, ensemencé en liquide Raulin, engendrera, en 3 à 6 jours,

une culture caractéristique. Au lieu du lapin, on pourra, bien entendu, s'adresser au pigeon.

L'aspergillus fumigatus sera distingué du penicillium glaucum qui, entre autres caractères différentiels, se développe à une basse température ; de l'aspergillus glaucus, qui jouit de la même propriété, possède des spores plus grosses et n'est pas pathogène ; de l'aspergillus niger, à aspect franchement noir sur tous les milieux, même sur gélose au liquide Raulin ; de l'aspergillus nigrescens, d'un noir sale, avec rameaux mycéliens beaucoup plus développés ; de l'aspergillus flavescens, d'un ton jaune vert caractéristique ; enfin de l'aspergillus sulfureus, à spores très petites et à pouvoir pathogène peu marqué.

FAVUS

Chez l'homme, le favus siège le plus souvent au cuir chevelu ; toutefois il peut se manifester également au niveau des parties glabres et des ongles. MM. Kaposi et Kundrat ont signalé la propagation de la maladie au tube digestif. Le favus s'observe *chez les animaux,* chez la souris en particulier, qui transmet fréquemment la maladie à l'homme par l'intermédiaire du chat (Saint-Cyr). On rencontre aussi l'affection chez le rat, le chien, la poule, le lapin.... etc. Le favus des diverses espèces animales paraît dû à plusieurs variétés de l'achorion Schönleini. Chez l'homme lui-même, on a décrit de telles variétés (Quincke, Unna, Frank). Toutefois, contrairement à ce qui se produit pour les tondantes, il n'existe ici aucun rapport entre ces variétés et l'aspect clinique des lésions.

Le *cheveu favique* sera étudié comme le cheveu tricophytique. Il suffit de le chauffer légèrement dans une goutte de potasse à 40 pour 100, déposée sur une lame de verre. On recouvre d'une lamelle et on examine de suite. On peut aussi enlever la potasse avec de l'eau et monter dans une goutte de glycérine. Si on désire conserver la préparation, on emploiera le procédé de Malassez. Il consiste à faire séjourner les cheveux 24 heures dans l'alcool-éther, puis 12 heures dans l'alcool absolu. On fait ensuite agir, à froid, la solution de potasse à 40 pour 100, jusqu'à éclaircissement complet. On passe successivement dans l'eau

et dans une solution acide d'acétate de potasse (pour neutraliser l'excès de potasse). On colore par l'éosine et on monte dans la glycérine.

Le grossissement donné par l'oculaire 1 et l'objectif 7 (Stiassnie) est très suffisant pour la recherche du parasite. Il est bon d'examiner avec un faible éclairage, par exemple à l'aide d'un diaphragme d'un à 2 millimètres d'ouverture ; avec une ouverture plus grande, on s'exposerait à ne plus distinguer les éléments du champignon. On constate, au microscope, que le cheveu est envahi par l'*achorion* sur une grande longueur. Toutefois, il n'est pas complètement recouvert de spores, comme cela a lieu avec les tricophytons. L'achorion apparaît sous forme de filaments flexueux et ondulés, toujours clairsemés, tandis que les tricophytons offrent des filaments rectilignes et plus nombreux. Les filaments faviques ne se ramifient jamais dichotomiquement, mais toujours par tri ou tétratomie, de façon à figurer grossièrement des sortes de tarses (tarses faviques). Les spores ne se sont jamais égales et arrondies et leur membrane ne possède jamais de double contour, comme chez les tricophytons ; elles sont inégales, rectangulaires et munies d'une enveloppe simple. Hors du cheveu, à sa racine, les *coupes* montreront, dans les éléments du follicule, des filaments sans direction régulière, pénétrant jusqu'à la hauteur du corps muqueux. A ce niveau ils se tassent, deviennent rectilignes et divergent autour de l'orifice pilaire. Ils forment ainsi le godet caractéristique.

L'achorion Schönleini est exclusivement aérobie. Il se cultive bien sur les milieux solides sucrés (Duclaux et Verujski), ou mieux encore peptonisés à 5 pour 100 et légèrement alcalins. Les cultures doivent être maintenues à la température de 33°. La glycérine favorise le développement du parasite.

M. Bodin conseille beaucoup le *milieu suivant* : eau 100 ; peptone 5-6 grammes ; glycérine 1-2 grammes. Il est préférable de faire les ensemencements dans de larges matras à fond plat, tels que les fioles de Gayon ou d'Erlenmeyer, afin que les colonies, dans leur progression excentrique, puissent s'étendre sans rencontrer les parois du vase. L'achorion ne pousse pas sur les milieux acides. Sur gélose, il forme un enduit jaune brunâtre, plissé, irrégulier, déprimé au centre et rappelant l'aspect des godets faviques. Sur pomme de terre, il croît très vite, en donnant une culture saillante, tourmentée, cérébriforme, d'une consistance qui rappelle celle de la pâte de carton. A la surface du bouillon, on voit apparaître de gros îlots très étalés, dont l'aspect est analogue à celui des cultures sur gélose. Toutes ces cultures dégagent constamment la même odeur de souris que les lésions cutanées.

Les *ensemencements* seront pratiqués comme ceux des tricophytons. On déposera un cheveu favique sur une lame de verre flambée et, à l'aide d'un fin scalpel stérile, on séparera la racine de la portion aérienne et on la divisera en tronçons aussi courts que possible. Avec un fil de platine, on transportera ces tronçons à la surface d'un tube de gélose, en les espaçant de plusieurs millimètres. Au bout de quelques jours, on verra apparaître les colonies, sous forme d'un fin mycélium grisâtre. Il existe souvent des souillures (staphylocoques, moisissures) ; mais, si on a opéré avec un nombre suffisant de fragments, il se trouve toujours quelques colonies pures.

Les *inoculations* du champignon du favus n'ont fourni que des résultats incertains. MM. Sabrazès et Dubreuihl auraient reproduit chez le lapin une pseudo-tuberculose, par inoculation intrapéritonéale et intraveineuse.

VACCINE. — VARIOLE

Vaccine.

Chacun connaît la mémorable découverte de Jenner. Personne n'ignore non plus qu'il a démontré l'origine équine du *cow-pox* (vaccine de la vache) et l'identité du *swine-pox* (vaccine du porc) avec le cow-pox. Les travaux du siècle dernier (Loy, Pételard, Bouley, Chauveau, etc.) ont confirmé et étendu ses vues. On sait aujourd'hui que la maladie des vaches leur est transmise par des gens qui ont manié des animaux atteints de cow-pox ou de horse-pox, — que la maladie de l'homme participe évidemment de cette double origine, — et que l'affection initiale est bien celle du cheval (*horse-pox*), la plus rare et la plus virulente.

Nous étudierons successivement les principaux caractères du virus vaccinal et la préparation du vaccin (animal).

Principaux caractères du virus vaccinal.

On ignore encore la *nature du microbe* de la vaccine. M. Calmette a vu, dans la lymphe fraîche, des grains très petits et mobiles et, dans la lymphe glycérinée, des grains plus gros et immobiles. Le nombre de ces corpuscules serait en proportion de la qualité du vaccin. Tous les essais de culture ont régulièrement échoué. Le virus résiste plusieurs semaines à la dessiccation et plus longtemps encore à l'action de

la glycérine, surtout si la température extérieure reste basse. Il existe d'ailleurs de grandes différences d'un échantillon à l'autre.

La *virulence* est limitée aux lésions, ou à peu près. Dans les lymphatiques qui partent du territoire inoculé, le virus est très difficile à mettre en évidence (expériences de M. Raynaud sur le cheval) ; avec le ganglion correspondant et les viscères, même difficulté (expériences de la Commission Allemande sur les génisses). Il ne faut donc pas compter sur ces divers organes pour obtenir un vaccin pur.

La vaccine se transmet aisément à l'homme, au singe, aux bovidés, au lapin et au cobaye. Le cheval n'est infecté qu'avec un virus très virulent (horse-pox). Le porc est peu sensible, la chèvre et le mouton encore moins. Les expériences concernant le chien auraient besoin d'être reprises systématiquement. Enfin on obtient, sur la cornée de la poule et surtout du pigeon, des petites vésicules à évolution rapide (Salmon).

L'*inoculation à l'homme,* soit par piqûre, soit par scarification, donne lieu à une éruption bien connue. Le 3e ou le 4e jour, apparaît une tache rouge, qui se surélève en papule le 5e jour. Cette papule s'élargit le 6e jour, devient blanchâtre au centre et s'entoure d'une auréole érythémateuse. Le 7e ou le 8e jour, on observe la pustule type, argentée, ombiliquée, cerclée de rouge vif. Le 9e ou le 10e jour, l'aréole s'étend, la base s'indure, la lésion devient douloureuse et s'accompagne de retentissement ganglionnaire et de phénomènes généraux, ordinairement légers. Le 11e jour la pustule se flétrit. Le 12e ou le 13e jour, survient la dessiccation ; une croûte noirâtre succède au bouton vaccinal et tombe vers le 20e ou le 25e jour, laissant une cicatrice indélébile, profonde, gaufrée, rayonnante. Telle est la vaccine de l'*enfant* ; chez l'*adulte,*

les pustules sont d'ordinaire moins plates, moins ombiliquées, mais, par contre, les réactions glandulaire et générale se montrent plus vives (Bousquet). La « fausse vaccine », considérée aujourd'hui comme une vaccine atténuée, débute dès le premier ou le second jour et se résume en une pustulette sans dépression centrale, qui sèche rapidement. On l'obtient avec des virus faibles ou chez des sujets déjà presque immuns, par variole ou vaccine antérieures.

L'*inoculation au singe* donne exactement les mêmes apparences. L'*inoculation*, par scarifications, *au veau* ou à la génisse, se traduit par des lésions encore analogues. Le 2e jour, c'est une rougeur superficielle autour des incisions ; le 3e ou le 4e jour, on observe des papules, qui se transforment le 5e jour en pustules ombiliquées. Le 6e jour, la maturation est complète ; puis survient la dessiccation. L'évolution est donc plus rapide que chez l'homme et le singe. Les animaux âgés sont moins réceptifs, certaines races également ; les jeunes buffles fournissent par contre d'excellent vaccin (Calmette). L'inoculation sous-cutanée ou intraveineuse confère l'immunité, sans engendrer aucune éruption ; de même pour l'inoculation sur la cornée. L'inoculation dans la chambre antérieure est suivie d'une irido-kératite intense.

Les *expériences* de MM. Calmette et Guérin *sur le lapin* confirment les résultats de M. Gailleton et de MM. Bard et Leclerc. Lorsqu'on veut obtenir des pustules par la voie endermique, il n'est pas indiqué de pratiquer des scarifications, même superficielles, lesquelles sont rarement suivies de bons résultats. On n'observe le plus souvent qu'une « fausse vaccine », parfois même on n'observe rien du tout. Il faut, après avoir rasé l'animal, badigeonner la peau avec la lymphe vaccinale. Il survient alors une éruption confluente tout à fait caractéristique. Le 2e jour, le derme se conges-

tionne vivement et se tuméfie ; le 3e jour, des pustules ombiliquées apparaissent, surtout sur le bord des placards surélevés et rouges. Puis arrive la dessiccation. Avec la pulpe recueillie le 4e jour, on peut faire aisément des passages. Si on inocule de la lymphe dans les veines du lapin et qu'on rase, 24 heures après, une certaine étendue de tégument, le virus vient s'y localiser et l'éruption classique se manifeste. On peut immuniser le lapin par inoculation sous-cutanée, intraveineuse, intracrânienne, intra-oculaire, intrathoracique, intratrachéale et par dépôt de vaccin sec dans les fosses nasales et sur la conjonctive. L'inoculation dans la cornée donne lieu à une éruption de petites vésicules. La *vaccine du cobaye* est analogue à celle du lapin.

L'infection du lapin nécessite toujours un virus très actif ; elle constitue donc un excellent moyen de contrôle du vaccin. L'*infection du cheval* nécessite un virus encore plus actif. L'inoculation intradermique produit des pustules caractéristiques, exceptionnellement un horse-pox généralisé. L'injection sous-cutanée confère l'immunité, le plus souvent sans éruption générale. Celle-ci survient quelquefois à la suite de l'infection digestive ou respiratoire, assez souvent à la suite de l'inoculation intraveineuse (Chauveau).

Faut-il rappeler que le vaccin immunise l'homme (et le singe) contre la variole. L'immunité contre cette affection, ou contre la revaccination, est créée chez l'homme (et le singe), le 9e jour ; chez le veau et la génisse, tantôt le 6e jour (inoc. cutanée et inoc. dans la chambre antérieure), tantôt le 8e (inoc. dans la cornée ou sous la peau) ; chez le lapin, tantôt le 5e jour (inoc. dans les veines), tantôt le 6e (inoc. dans la peau ; sous la peau ; dans le cerveau et sous la dure-mère ; dans la chambre antérieure).

Nous ne pouvons insister ici sur les intéressantes

recherches de MM. Beclère, Chambon et Ménard, concernant les propriétés préventives et thérapeutiques du sérum des génisses immunisées. Ces recherches découlent logiquement des expériences anciennes de M. Raynaud, lesquelles représentent l'origine véritable de la sérothérapie.

Préparation du vaccin (animal).

Nous l'indiquerons sommairement; elle est d'ailleurs très facile. On choisira des veaux ou des génisses sevrés depuis quelques semaines et on les soumettra d'abord à *l'épreuve de la tuberculine*. Les animaux seront tenus proprement et placés dans des box entièrement revêtus de ciment; la litière sera fréquemment renouvelée.

L'inoculation se fera sur un des côtés du thorax. On rasera la région avec soin et on attendra quelques heures avant de pratiquer les scarifications. L'animal étant couché sur une table ou maintenu debout, on incisera superficiellement le derme. Les traits auront environ 1^cm 1/2 de long et seront distants de 3-4 centimètres. Il faut absolument éviter l'écoulement de sang. Après avoir fait une à deux rangées de scarifications, on insère la lymphe dans chacune d'elles, à l'aide de la lancette ou du scalpel dont on s'est servi. Puis on continue, jusqu'à ce qu'on ait pratiqué de 100 à 150 inoculations, suivant les cas. Le côté vacciné sera recouvert d'un tablier en toile bien propre et l'animal isolé dans son box.

C'est en moyenne le 6e jour qu'on récolte le vaccin. Pour cela, la génisse ou le veau étant couchés sur une table, on place à la base de chaque pustule une pince à mors longs et étroits. On fait sauter la croûte au bistouri et on gratte la pulpe avec le même bistouri (convexe et à lame large). Les instruments

devront avoir été stérilisés, ou tout au moins bouillis.

La pulpe est triturée dans un mortier stérile (ou dans des broyeurs spéciaux), en ajoutant peu à peu de la glycérine neutre. On obtient ainsi l'*électuaire vaccinal*, que l'on distribue dans de petites ampoules scellées. On remplit celles-ci en aspirant au moyen d'un tube effilé adapté sur le tube à vaccin. Il faut laisser, aux extrémités de l'ampoule, un espace libre de 2 à 4 millimètres. La pulpe glycérinée sera conservée dans un endroit frais, mieux encore dans une glacière.

Le vaccin animal, préparé tout d'abord par les médecins napolitains, a fini par remplacer le vaccin humain. En l'additionnant de glycérine, MM. Chambon et Lanoix ont réalisé un très grand progrès. La glycérine conserve bien le virus et tue assez rapidement la plupart des germes associés ; il s'en faut de beaucoup cependant que la purification soit aussi complète qu'on l'a dit. Tous les moyens préconisés pour obtenir des *vaccins purs* (vieillissement prolongé, séjour prolongé à 37°) sont infidèles et exposent à un affaiblissement et même à une destruction complète du virus vaccinal.

Notons que les auteurs varient d'opinion sur la proportion de glycérine qu'on doit ajouter à la pulpe. La plupart préconisent une à deux parties, pour une partie de pulpe ; certains font un mélange à parties égales de pulpe, de glycérine et d'eau. Ce qui importe surtout, c'est de ne pas trop diluer le vaccin.

Variole.

Nous n'aborderons pas ici la question, encore controversée, de l'identité de la variole et de la vaccine. Nous dirons seulement que, selon Numan, Ceely, Reiter, van Thiele, Voit, Bollinger, Pfeiffer, Fischer, Haccius et Eternod, on peut transmettre la variole à

la *vache* et la transformer ainsi en vaccin, après quelques passages. La vache acquiert en même temps l'immunité contre la vaccine. M. Chauveau pense qu'on donne en effet la variole, mais qu'il n'y a pas transformation en vaccine. Malgré toute son autorité, il paraît difficile de ne pas tirer une conclusion opposée d'expériences comme celles de M. Fischer et de MM. Haccius et Eternod.

La transmissibilité au *cheval* semble incontestable (Chauveau). La transmission au *singe* (Eilerts de Haan) se pratique sans difficulté et donne des résultats constants, ainsi qu'a pu le vérifier un de nous. M. Eilerts de Haan, après 6-7 passages par le singe, obtient un virus qui donne des éruptions vaccinales types au veau.

La variole, inoculée dans la cornée de la poule et surtout du pigeon et du lapin, produit, comme la vaccine, une vésicule à évolution rapide.

RAGE

L'*habitat du virus* rabique *in vivo* est double ; il réside à la fois dans le système nerveux et les glandes en grappe. Au sein du système nerveux, il siège surtout dans les centres encéphalo-médullaires et plus particulièrement au niveau du bulbe, mais il existe aussi, quoique moins abondamment, dans les nerfs périphériques. Il paraît également réparti entre la substance grise et la substance blanche. Parmi les glandes, on doit citer en première ligne l'appareil salivaire, mais le virus peut se rencontrer dans les glandes lacrymale et mammaire et dans le pancréas. Par contre, ni le sang, ni les viscères (foie, rate, poumons) ne se montrent virulents.

Le *diagnostic clinique* de la rage est souvent très délicat chez les animaux, le chien particulièrement. On devra, toutefois, attacher une grande importance à la glycosurie ; celle-ci existe dans plus de la moitié des cas chez le chien et dans 15 à 20 pour 100 des cas chez les ruminants. L'*examen anatomo-pathologique* ne fournit aucune donnée précise ; la présence de corps étrangers dans l'estomac constitue un signe inconstant, trompeur même, car il peut s'observer à l'autopsie d'animaux ayant succombé à d'autres maladies. La présence de nodules leucocytaires dans le bulbe (Babès) ou dans les ganglions rachidiens (van Gehuchten et Nelis) est tout aussi infidèle (Carlos França). C'est donc, avant tout, à l'expérimentation qu'il faut avoir recours pour asseoir le diagnostic. Il

ne peut être question ici, bien entendu, ni d'examen microscopique, ni de cultures, la nature intime du virus rabique nous étant, jusqu'à présent, totalement inconnue.

Tout médecin doit pouvoir faire un *diagnostic rigoureux* de rage *chez un animal mordeur*. On procèdera de la manière suivante. Les animaux ne seront pas tués, mais solidement attachés et mis en observation. Si, pendant les 7 ou 8 jours (terme extrême) qui suivent l'accident, ils ne présentent aucun symptôme morbide, on les mettra en liberté et on rassurera le mordu. Il arrive, parfois, que les manifestations rabiques n'apparaissent chez l'animal que 4 ou 5 jours après la morsure. Mais, comme MM. Roux et Nocard ont démontré que la salive du chien est déjà virulente pendant les prodromes de la maladie, il convient, dans de tels cas, de conseiller aux mordus de suivre le traitement antirabique. Lorsque l'animal donne des signes de rage ou présente des symptômes fortement suspects, on le tue et on pratique son *autopsie*. Après avoir coupé les poils et lavé la peau au crésyl ou au tricrésol, on enlève la moelle et l'encéphale, après incision parallèle à l'épine dorsale (voir Technique générale). On se sert, bien entendu, d'instruments stérilisés. Si on est pressé, on peut se contenter d'un fragment de bulbe. Il suffit alors de faire une petite incision au niveau de la région postérieure du cou, de réséquer les lames vertébrales des deux ou trois premières cervicales et de prélever, avec les ciseaux, un fragment de tissu nerveux que l'on place dans un verre flambé. On peut aussi couper le cou du chien et aspirer la substance nerveuse au niveau du trou occipital. Quoi qu'il en soit, le fragment de bulbe sera broyé à l'aide d'une baguette de verre flambée et la pulpe ainsi obtenue émulsionnée avec du bouillon ou de l'eau stérilisés. On passera sur

mousseline et on inoculera. L'animal de choix est le *lapin*, le procédé le plus sûr l'injection intra-cérébrale, ou l'injection sous-dure-mérienne après trépanation ; nous en avons déjà décrit la technique. On peut aussi pratiquer l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil ; la pulpe introduite est résorbée en quelques jours et, si l'opération a été faite purement, aucun trouble ne doit persister dans les milieux oculaires. L'incubation dure de 10 à 20 jours, puis la rage se déclare, le plus souvent sous sa forme paralytique. La maladie se traduit tout d'abord par un peu d'incertitude dans les mouvements et de l'irritabilité, puis par une paralysie du train postérieur. Quelquefois cependant, le lapin présente le type de la rage furieuse. La mort survient 4 à 5 jours après le début des accidents. A l'autopsie, on ne constate aucune lésion, si ce n'est un certain degré de congestion des méninges et de la substance nerveuse. Notons que, dans certains cas, le virus des rues se comporte, chez le lapin, comme le virus fixe.

Le *cobaye* peut également être utilisé. Il prend d'ordinaire la rage furieuse, mais parfois il présente un état paralytique qui précède la mort de 12 à 14 heures. On a plus rarement recours à l'inoculation d'autres espèces animales, au chien, au chat, par exemple, à cause du danger des morsures.

Chez le chien, qu'elle soit spontanée ou expérimentale, la *rage peut présenter deux types* : la rage furieuse et la rage mue ou muette. Dans la première forme, la voix est modifiée ; l'aboiement revêt un timbre aigu, bitonal, très particulier. L'animal se jette sur tout ce qu'il rencontre, avale tout ce qu'il trouve. Il ne peut rester en place. Il est en proie à des hallucinations et meurt après quelques jours au milieu d'un accès de fureur. Presque toujours, la mort est précédée de paralysie du train postérieur, puis du train antérieur.

La rage mue se traduit dès le début par une paralysie de la mâchoire, qui reste pendante et d'où s'écoule de la bave, ainsi que par une paralysie des muscles laryngés. Parfois, la rage furieuse précède la rage muette. Quelle que soit sa forme, la maladie ne dure que 4 à 5 jours ; rarement elle va jusqu'à 12. Les phénomènes paralytiques apparaissent ordinairement dès le quatrième jour. Ajoutons, qu'à l'autopsie des animaux, l'impossibilité d'obtenir des cultures avec les centres nerveux constitue un caractère négatif important.

L'inoculation sous-dure-mérienne et même l'inoculation intra-oculaire ne peuvent être pratiquées que si le bulbe a été prélevé chez un animal mort ou sacrifié depuis quelques heures seulement et avec des précautions d'asepsie suffisantes. Lorsque plusieurs jours se sont écoulés entre la mort de l'animal et l'ablation du bulbe, l'injection sera faite sous la peau ou dans les muscles (on pourra cependant, à tout hasard, inoculer parallèlement un lapin dans le cerveau). On choisira comme lieu d'élection les muscles de la nuque et même, pour gagner du temps, ceux de la face. Le virus rabique présente à la putréfaction une résistance considérable. Même lorsque la mort remonte à 15 jours ou 3 semaines, l'inoculation des centres nerveux peut encore être utile. On se rappellera qu'après l'injection sous-cutanée ou intra-musculaire, l'incubation de la maladie est sensiblement plus longue qu'à la suite de l'injection intra-oculaire et surtout intracrânienne (sous-dure-mérienne ou intra-cérébrale).

Lorsqu'on ne peut pas employer immédiatement le bulbe, ou lorsqu'on désire l'envoyer à un Institut antirabique pour que les recherches y soient faites, il suffit de le placer dans un flacon qui contient de la *glycérine neutre*, marquant 30° Baumé et stérilisée.

Le virus se conserve ainsi pendant deux ou trois mois et même davantage, sans s'affaiblir sensiblement ; il est toutefois indiqué de le maintenir à basse température (Roux).

Ce que nous avons dit dans une autre partie de cet ouvrage, au sujet de l'atténuation du virus rabique, sera suffisant pour tous ceux qui ne désirent pas faire de la *méthode pastorienne* une étude particulièrement approfondie. Nous renvoyons les autres aux traités spéciaux. Indiquons simplement en terminant que les *herbivores peuvent être immunisés à l'aide d'un procédé très simple, l'inoculation intraveineuse du virus.* Cette inoculation ne donne pas la rage, ainsi que M. Galtier l'a constaté le premier, mais confère au contraire une résistance solide. Pour vacciner les animaux, il suffit de leur injecter dans la jugulaire une émulsion de bulbe de lapin tué par le virus fixe (ou tout simplement une émulsion de bulbe du chien mordeur). L'émulsion sera passée à travers un linge fin et inoculée doucement à la dose de 10-15 centimètres cubes pour le cheval et le bœuf et de 4 à 6 centimètres cubes pour la chèvre et le mouton. On répétera l'opération quelques jours après. L'intervention est encore efficace 3 à 4 jours après l'infection expérimentale et sans doute plus longtemps après la contamination accidentelle. Les grands animaux traités seront ensuite laissés au repos pendant un mois au moins.

MALADIES PROPRES A L'HOMME

FIÈVRE TYPHOIDE

I. *Principaux caractères du bacille typhique.*

Caractères morphologiques.

Examiné sans coloration, le b. typhique (fig. 139) se présente sous l'aspect d'un petit bâtonnet, deux à cinq fois plus long que large, à extrémités arrondies et très mobile. Il se colore facilement avec toutes les couleurs basiques d'aniline, mais ne prend pas le Gram. Le corps bacillaire est homogène le plus souvent, mais il présente parfois en son centre un espace clair. C'est la forme dite « en navette ». D'autre part, dans les cultures sur pommes de terre, il n'est pas rare de rencontrer à une extrémité un renflement, qui prend ou non la matière colorante. Ni l'une ni l'autre de ces deux apparences ne seront confondues avec des spores.



Fig. 139. — Bacille typhique (ou d'Eberth).

Nous devons ajouter que les dimensions du bacille sont sujettes à d'assez grandes variations ; court et trapu sur pomme de terre, il se montre plus long et plus grêle en bouillon ; il peut, dans les vieilles cultures, se présenter sous forme de filaments. La mobilité est due à la présence de cils vibratiles ; chaque bacille en possède de 10 à 12, assez régulièrement répartis sur toute sa surface.

Caractères de culture.

Le bacille d'Eberth se développe rapidement en bouillon. Dès la 12ᵉ heure, il produit un trouble qui va en s'accentuant par la suite ; en agitant la culture, on voit tourbillonner des ondes moirées. Un dépôt assez abondant se forme finalement au fond du tube ; le bouillon se clarifie alors, en prenant une teinte brunâtre.

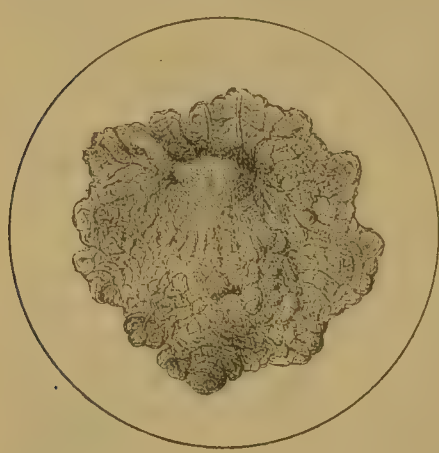


Fig. 140. — Colonie de bacille typhique sur gélatine.

La gélatine n'est pas liquéfiée ; l'ensemencement par piqûre n'a rien de caractéristique. Par strie, sur gélatine inclinée, on obtient un dépôt léger, blanc bleuté, presque translucide, d'aspect très spécial. Dans les plaques, on voit se former des colonies bleutées à contours sinueux, dont la surface présente parfois un aspect strié, tourmenté (fig. 140).

Sur gélose, il se forme une couche épaisse, sans aucune particularité distinctive. L'aspect sur pomme

de terre est plus caractéristique ; le bacille typhique y forme une traînée humide, peu apparente, qu'on a comparée assez heureusement à celle que laisserait le passage d'un limaçon. Elle brunit un peu à la longue. Le b. d'Eberth pousse sur artichaut et sur gélatine artichaut, sans y donner de coloration verte (Roger, G. Roux). Le lait n'est pas coagulé. Enfin on n'observe, dans le milieu Fränkel, aucune culture visible.

Caractères biologiques.

Le bacille d'Eberth ne fait fermenter ni le saccharose, ni le lactose. On s'assure de ce dernier point, en pratiquant des ensemencements soit dans du lait, soit dans du bouillon lactosé, additionné de carbonate de chaux et de teinture de tournesol. Il ne forme pas d'indol. Il ne donne pas de bulles dans la gélose glucosée à 2 pour 100, ensemencée en couche haute. Il ne pousse jamais dans le bouillon contenant, par litre, plus d'un centigramme d'acide arsénieux, mais il peut être entraîné à vivre dans les milieux arséniés (Thoinot et Brouardel). Il vaccine en quelque sorte la gélatine et la gélose contre son propre développement. Si on enlève par grattage la couche microbienne qui recouvre ces milieux et qu'on réensemence le b. d'Eberth, il ne se développe pas à nouveau.

Le b. typhique se laisse enfin agglutiner par le sérum des malades atteints de fièvre typhoïde, ainsi que nous aurons occasion de l'indiquer à propos du sérodiagnostic et par celui des animaux immunisés, ou simplement infectés.

Caractères d'inoculation.

Il n'existe chez les animaux aucune affection « spon-

tanée » causée par le b. typhique. L'un de nous a montré qu'en faisant ingérer, à des lapins et à des rats inanitiés, le bacille d'Eberth à doses massives, on pouvait produire chez eux une maladie très semblable à la dothiénentérie humaine. Des résultats analogues ont été obtenus, chez le lapin et le singe, par MM. Chantemesse et Ramond. Ces résultats sont toutefois fort irréguliers ; ils ne sont susceptibles d'aucune application pratique au point de vue diagnostique. On doit se contenter couramment de reproduire chez les animaux une septicémie qui ne rappelle en rien la maladie humaine. L'animal de choix est le cobaye. Il succombe généralement, au bout de 48 à 72 heures, à l'injection intrapéritonéale de 2 à 3 centimètres cubes de culture en bouillon (les émulsions de gélose tuent en 12 heures, si la dose et la virulence sont assez grandes). Les symptômes présentés pendant la vie sont les suivants. Dès les premières heures qui suivent l'inoculation, l'animal devient triste et refuse toute nourriture. Il pousse des cris lorsqu'on le touche, particulièrement si on vient à palper l'abdomen. Bientôt, il demeure pelotonné dans un coin de la cage, la tête tombante, en proie à une sorte de somnolence. Les poils se hérissent ; les yeux larmoient ; l'animal se couche enfin sur le côté et une agonie commence, qui peut durer 24 heures et davantage. 1 à 2 centimètres cubes suffisent à amener la mort, si on fait en même temps une injection sous-cutanée de cultures stérilisées de coli bacille ou de streptocoque. Dans l'un et l'autre cas, à l'autopsie, on constate la présence d'un exsudat péritonéal assez abondant, dans lequel les bacilles typhiques sont très nombreux ; on les rencontre en nombre variable dans le sang du cœur, le foie, la rate, etc. La souris peut également être utilisée ; l'injection intrapéritonéale d'un centimètre cube de

culture jeune détermine presque constamment la mort en 24 à 72 heures ; on constate, à l'autopsie, la présence du b. typhique dans le sang et les organes. Le lapin est moins réceptif. La maladie expérimentale du chien, très complètement étudiée par MM. Lépine et Lyonnet, n'est guère susceptible d'applications pratiques.

Rappelons que l'immunisation des animaux, du cobaye et du lapin en particulier, est très facilement et très rapidement réalisée à l'aide d'injections à doses croissantes de cultures soit vivantes (Beumer et Peiper), soit stérilisées par la chaleur (Sanarelli, Chantemesse et Widal). Ces injections font apparaître rapidement, dans le sang des animaux traités, des propriétés agglutinantes ; on conçoit qu'il y ait là un moyen de contrôle précieux dans certains cas.

II. *Répartition du b. d'Eberth dans l'organisme des typhiques.*

Le b. d'Eberth est constant dans la *rate*, les *ganglions mésentériques* et le *foie* des typhiques. On le trouve toujours également dans les *follicules clos de l'intestin*. Lorsque ceux-ci s'ulcèrent, vers le milieu du deuxième septenaire, les bacilles passent dans les matières fécales. Le b. typhique est susceptible d'apparaître dans le sang et l'urine, mais sa fréquence y reste beaucoup moindre. Il se rencontrerait dans le *sang de la circulation générale*, surtout lors de fièvre typhoïde grave ; M. Castellani l'a isolé dans ces conditions 12 fois sur 14 ; un certain nombre d'observations ont été également publiées par différents auteurs. Plus fréquemment, semble-t-il, on peut l'isoler des

taches rosées (Neuhauss 9/15, Besson, 1/19, Rutimeyer 1/10, Neufeld 13/14, Curschmann 14/20, Fränkel 4/4). Il a été rencontré tout d'abord dans l'*urine* par M. Bouchard (31/66), puis par MM. Hüppe (1/18), Koujajeff (3/20), Richardson (9/38), Karlinski (31/44), Petruschky (3/50) et Horton Smith (17/45). Il convient toutefois de ne tenir compte, ici comme ailleurs, que des recherches publiées depuis la découverte de la séro-agglutination spécifique. M. Besson a recherché le b. d'Eberth dans l'urine de 33 typhoïdiques ; pour cet auteur, il n'apparaît que lorsque les urines sont albumineuses ; on le trouve dans 40 pour 100 des urines, contenant de l'albumine en quantité égale ou supérieure à un gramme par litre. D'après M. Richardson, lorsque le bacille typhique passe dans l'urine, on trouve toujours en même temps des cylindres et de l'albumine, mais la réciproque n'est pas vraie.

D'après M. Giuzetti, le b. d'Eberth serait constant dans la *moelle des os* (on sait que celle-ci, de jaune devient rouge, au cours de la dothiénentérie) ; il serait particulièrement abondant dans la moelle des fémurs. Il se rencontre assez fréquemment dans la *vésicule biliaire*. Enfin il a été trouvé, *exceptionnellement* (en dehors de toute complication), dans les testicules, les amygdales et divers autres organes. Il nous suffira de mentionner le rôle que joue le b. d'Eberth dans un grand nombre de *complications* de la fièvre typhoïde (pleurésies purulentes, néphrites, phlébites, laryngites, broncho-pneumonies, angiocholites suppurées, thyroïdites, méningites, abcès du foie, orchites, ostéites, etc.). Chez les *anciens typhiques*, on a pu isoler le b. d'Eberth des abcès osseux, même après 7 années ; ces faits sont du reste rares, car la phagocytose, très active dans les suppurations typhiques, aboutit d'ordinaire rapidement à la stérilité du pus (Ivan Koul, Besson).

Il est intéressant de comparer la répartition du b. d'Eberth et celle de la propriété agglutinante, dans l'organisme typhique. MM. Arloing et Courmont ont vu que l'agglutination, maxima avec le sang, se montrait minima avec les pulpes splénique, hépatique, ganglionnaire, c'est-à-dire, précisément, avec le suc des organes qui sont le siège de l'infection. M. Widal n'admet pas qu'il y ait relation inverse entre la présence du b. d'Eberth et l'intensité du pouvoir agglutinant.

III. *Diagnostic bactériologique de la fièvre typhoïde.*

A. Diagnostic sur le vivant

Il résulte de ce qui précède que le diagnostic de la dothiénentérie pourra être assuré de deux façons, par la *recherche du microbe* pathogène et par le *sérodiagnostic*. La recherche pourra se faire dans la rate, le sang, l'urine, ou les matières fécales (nous laissons de côté les localisations diverses, mentionnées plus haut).

1° *Recherche dans la rate (ponction splénique).*

La ponction de la rate, préconisée pour la première fois par MM. Philippowitch et Lucatello, a été longtemps classique. C'est un moyen infidèle, *dangereux* même. Il est tombé, depuis le sérodiagnostic, dans un oubli mérité. Le cas échéant, on ponctionnera l'organe, avec une seringue stérilisée, en suivant la technique que nous avons indiquée dans la première partie de cet ouvrage. Le sang obtenu sera ensemencé d'une part en bouillon ordinaire, de l'autre en bouillon additionné de typhus-sérum. Tel est le meilleur moyen d'arriver rapidement au diagnostic

(Remlinger). On peut se demander si la ponction hépatique ne serait pas préférable de beaucoup à la ponction splénique.

2° *Recherche dans le sang.*

On s'adressera au sang de la *circulation générale* ou à celui des *taches rosées*. Dans les deux cas, plusieurs auteurs recommandent de diluer toujours le sang aussitôt après son prélèvement, afin d'éviter l'action bactéricide du sérum sur le bacille d'Eberth. M. Castellani ensemence 8 à 40 gouttes de sang (pris dans la veine) dans 300 centimètres cubes de bouillon. M. Neufeld ensemence le sang des taches rosées dans une quantité suffisante de bouillon et dans l'eau de condensation de quelques tubes de gélose. En inclinant cette eau (comme dans le procédé Veillon) on répartit les germes sur le milieu solide. M. Neufeld conseille de toujours combiner les cultures liquides et solides. M. Fränkel excise les taches, les place à 37°, dans du bouillon, pendant au moins 18 heures, puis fixe au formol, inclut et débite en coupes. Les *coupes* montrent des amas caractéristiques. Ce procédé, qui a réussi 4 fois sur 4, paraît néanmoins bien peu pratique.

3° *Recherche dans l'urine.*

Cette recherche ne saurait rendre de grands services au point de vue du diagnostic précoce, parce que le bacille typhique ne se rencontre guère dans l'urine avant le 15e jour. Par contre, il peut y persister longtemps durant la convalescence (jusqu'au 70e jour dans un cas, — Horton Smith) et fournir ainsi un précieux élément de diagnostic rétrospectif.

4° *Recherche dans les matières fécales.*

La recherche du b. d'Eberth dans les selles est lon-

gue et difficile. Le bacille n'y peut apparaître avant l'ulcération des plaques, c'est à dire avant le 10e ou le 12e jour; de plus, l'un de nous a isolé, de l'intestin de personnes saines ou atteintes d'affections autres que la dothiénentérie, un bacille qu'il a été impossible de distinguer du typhique le plus authentique. D'autres auteurs ont fait pareille constatation. On conçoit donc mal que quelques savants puissent mettre l'ensemencement dans le milieu d'Elsner (Yemma), dans le milieu de Piorkowski (Schulze et Krause) ou dans la « gélatine différentielle » (Rémy), en parallèle avec le sérodiagnostic. Nous allons décrire cependant les méthodes d'Elsner et de Remy, parce qu'elles rendent de grands services dans l'étude *scientifique* de la dothiénentérie.

Recherche par la méthode d'Elsner. — Voici comment nous employons cette méthode : une anse de matières diarrhéiques, diluée dans 10 centimètres cubes d'eau stérilisée, sert à ensemencer, à des taux divers, une série de tubes de gélatine d'Elsner, qui sont ensuite coulés en boîtes de Petri. Après 48 à 72 heures, on commence à apercevoir, au microscope puis à l'œil nu, des colonies d'un blanc opaque, qui augmentent rapidement de volume et prennent bientôt un aspect brunâtre : ce sont des colonies colibacillaires. Avec un retard de 24 ou 48 heures sur les précédentes, apparaissent les colonies typhiques, le plus souvent sous forme de gouttelettes incolores, brillantes, plus finement granuleuses, au microscope, que les colonies coliennes. On ne se fiera pas absolument sur ces différences dans l'aspect extérieur et on ensemencera en bouillon toutes les colonies suspectes. Le contenu des tubes sera examiné au microscope après 24 heures d'étuve et on rejettera tous ceux qui ne montreront pas des bacilles mobiles, se décolorant par la méthode de Gram. Les autres cultures, purifiées s'il y a lieu

par une nouvelle séparation en milieu d'Elsner, seront soumises aux diverses épreuves, employées pour reconnaître le b. typhique du b. coli. On peut se contenter pratiquement, croyons-nous, d'ensemencer les cultures en milieu Fränkel. Celles qui ne s'y développent pas seront seules soumises au sérodiagnostic.

Recherche par la méthode de Remy. — 0,2 centimètres cubes de matières fécales sont introduits dans 10 centimètres cubes d'eau stérilisée. 1, 2, 3 anses servent à faire des plaques, avec la gélatine différentielle dont nous avons donné ailleurs le mode de préparation. Ces plaques sont, autant que possible, placées à la température de 20 à 22°. Les colonies de b. coli et le b. d'Eberth poussent au bout de deux jours. Les colonies coliennes sont les unes profondes, les autres superficielles ; les colonies profondes se montrent arrondies, ovoïdes, parfois fusiformes et offrent une coloration brun jaunâtre ; de fines bulles de gaz, provenant de la décomposition du lactose, les accompagnent parfois ; les colonies superficielles sont les unes globuleuses, d'une coloration brun jaunâtre, les autres étalées, à contours irréguliers. Au début, elles apparaissent parfois transparentes et bleutées, mais elles deviennent rapidement opaques. Les colonies typhiques sont également profondes ou superficielles. Les colonies profondes, d'une coloration blanc bleutée, restent plus petites que les coliennes, mais cependant visibles à l'œil nu ; elles ne donnent jamais de bulles de gaz. Les colonies superficielles ne sont généralement bien visibles qu'au 3e jour ; au début, elles rappellent l'aspect des moisissures, plus tard elles s'étalent, deviennent plus bleutées et peuvent atteindre parfois les dimensions d'une pièce de 50 centimes. Les staphylocoques, les streptocoques et un grand nombre d'autres organismes poussent

également dans la gélatine de Rémy, qui n'a aucune propriété strictement élective ; toutefois les microbes liquéfiants s'y développent mal. M. Rémy conseille, dès que les colonies sont apparues, de marquer au crayon celles que l'on veut repiquer, puis de les prélever, à l'aide d'une anse de platine stérilisée, après les avoir circonscrites en entamant le milieu. Le petit cube ainsi obtenu est placé dans un tube de bouillon que l'on porte à l'étuve à 37°. Le lendemain, cette culture sert à chercher la réaction agglutinante. On en ensemence également 1 ou 2 anses dans un tube de gélatine (différentielle ou non) lactosée, liquéfiée au préalable. Après agitation, ce tube est plongé dans l'eau froide, pour obtenir une solidification rapide, puis porté à 20°-22°. Dans ces conditions, le b. coli donne des bulles abondantes après 24 heures, tandis que le b. d'Eberth n'en donne pas.

5° *Sérodiagnostic.*

Le sérodiagnostic de la fièvre typhoïde repose sur ce fait que, dans le sang des typhiques, il se produit une substance qui jouit de la propriété d'*immobiliser et de réunir en amas* les bacilles d'Eberth contenus dans les cultures. Cette substance se montre inactive vis-à-vis de toute autre espèce de bactéries. Ses propriétés sont donc spécifiques. D'où la haute valeur diagnostique de la séroréaction (Widal).

Technique de l'épreuve de Widal. — A) **Manière de recueillir le sang.** — Laisser pendre la main du malade ; savonner la pulpe du pouce, puis la laver à la liqueur de van Swieten ; enlever le sublimé en faisant couler de l'alcool et l'alcool en faisant couler de l'éther. Si on veut une plus grande asepsie, on recouvrira les parties désinfectées avec du collodion. On fait, à la lancette, une ponction large et profonde et on reçoit le sang qui s'écoule dans un

tube à fond plat court et large, préalablement bouché à l'ouate et stérilisé. Pour faciliter l'écoulement du sang, masser le pouce de la racine vers la pulpe. Il est indiqué de recueillir au moins 1 centimètre cube de sang.

B) **Manière de prélever le sérum.** — Après avoir rebouché le tube, on le laisse en repos dans un endroit frais ; puis, lorsque la coagulation s'est effectuée, on aspire le sérum avec une pipette stérilisée, dont on referme ensuite l'effilure. Si on veut transporter au loin le sérum, on le recueille dans une pipette étranglée, qu'on transforme aisément en ampoule.

C) **Épreuve n° 1.** — *Action du sérum sur le b. typhique déjà développé.* — On ajoute, dans un tube ou un verre de montre, un volume de sérum à 10 volumes de culture jeune de bacille typhique (bouillon). Il n'est pas indispensable d'opérer aseptiquement. Au bout d'un temps variable (de quelques minutes à une demi-heure en général) on remarque que la culture, d'abord uniformément trouble, s'est éclaircie en laissant déposer des flocons. Ceux-ci, examinés au microscope (fig. 141), se montrent constitués par des amas de b. typhiques qui ont perdu leur mobilité. Il est aisé de suivre toutes les phases du phénomène en étudiant le mélange au microscope après l'avoir fait de préférence en goutte pendante ; on voit alors l'immobilisation et l'agglutination se produire sous les yeux.

D) **Épreuve n° 2.** — *Action du sérum sur le développement du b. typhique.* — On mélange (l'asepsie est ici indispensable) un volume de sérum à 10 volumes de bouillon et on ensemence le tout avec une trace de bacille typhique. On fait, parallèlement, un ensemencement témoin dans un tube de bouillon non additionné de sérum. Après 12 heures de séjour à l'étuve à 37°, la culture témoin apparaît absolument

classique (trouble uniforme, pas de grumeaux par agitation), tandis que la culture dans le bouillon-sérum revêt le type streptococcique (liquide clair, avec dépôts floconneux qui se dissocient plus ou moins par agitation). Au microscope, on reconnaît que le dépôt de la culture en bouillon-sérum est constitué par des amas de b. typhique immobiles.

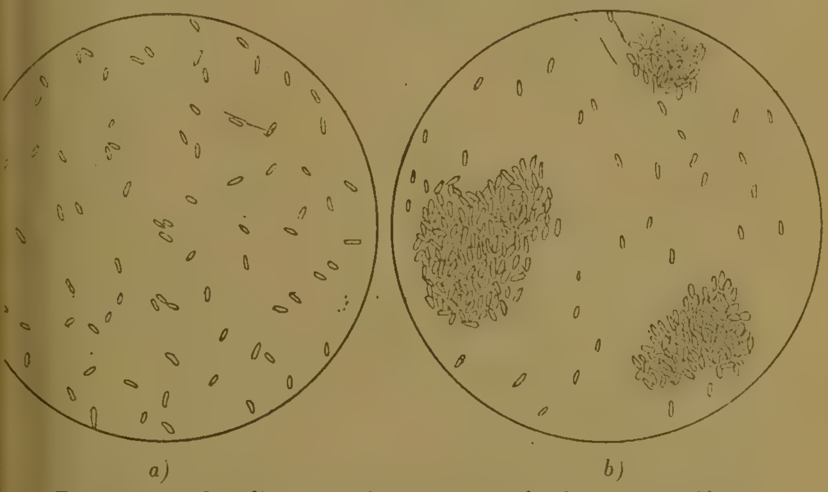


Fig. 141. — Sérodiagnostic de la fièvre typhoïde : *a)* négatif, *b)* positif (schématique).

E) **Valeur comparative des épreuves nos 1 et 2.** — Bien que les deux épreuves soient également démonstratives, il est bon de les effectuer parallèlement dans tous les cas où la chose est possible. L'une des deux épreuves, en effet, peut laisser dans le doute. Pour l'épreuve n° 1, l'agglutination est quelquefois tardive ou incomplète ; elle peut manquer de netteté dans les cas où on a dû opérer avec une vieille culture. Pour l'épreuve n° 2, les résultats sont quelquefois très difficiles à interpréter, lorsque le sérum n'a pas été recueilli aseptiquement et contenait des germes qui se sont développés à l'étuve. D'autre part, l'épreuve n° 1, si rapide et si commode, est toujours moins

sensible que l'épreuve n° 2. Il faut donc, si on le peut, combiner les deux procédés.

F) **Remarques.** — Lorsqu'on ne peut recueillir que quelques gouttes de sang et que celui-ci doit être expédié au loin, on a conseillé de faire tomber les gouttes sur du papier ordinaire stérilisé et de les laisser sécher. On délaie plus tard chaque goutte dans 2 gouttes d'eau et on mélange avec 8 gouttes de culture de b. typhique. M. Widal a vu que le sang ainsi desséché pouvait conserver ses propriétés agglutinantes au moins pendant six mois. Toutefois, cette méthode, essayée un grand nombre de fois en Tunisie par l'un de nous, lui a donné de médiocres résultats.

Si la coagulation du sang a été gênée et que le sérum soit rouge, le résultat des deux épreuves est souvent bien difficile à interpréter à l'œil nu. On ne se prononcera donc qu'après un examen microscopique. Celui-ci peut même laisser dans le doute, car les hématies deviennent souvent de vrais centres d'attraction moléculaire pour les bacilles typhiques. M. Pfühl conseille, dans ces cas, d'étendre le sérum rouge de 10 fois son volume d'eau et d'ajouter 1 partie égale de culture typhique (ou de bouillon, pour l'épreuve n° 2).

Bien que plusieurs auteurs admettent la possibilité de réaliser aisément l'épreuve n° 1 avec des cultures anciennes, il est infiniment plus prudent d'employer des cultures de 24 heures. Et, comme dans le bouillon celles-ci peuvent offrir de petits grumeaux, on aura recours à d'autres milieux toutes les fois que la chose sera possible, par exemple à l'eau peptonisée à 1 pour 100, ou à l'eau peptonisée à 2 pour 100 et glucosée ou glycérinée à 1 pour 100. Dans ces milieux, les cultures restent parfaitement homogènes et sans amas.

Lorsque le sang n'a pu être recueilli aseptique-

ment, on fera bien, pour l'épreuve n° 2, d'ajouter 0,5 pour 1 000 d'acide phénique au milieu de culture. Cette dose, à laquelle le b. typhique reste insensible, empêchera le développement des impuretés contenues dans le sérum (Ch. Nicolle).

D'après MM. Widal et Sicard, on peut réaliser l'épreuve n° 1 avec des bacilles morts (cultures tuées à une température qui n'excède pas 57° à 60°; ou à l'aide du formol du commerce, 1 pour 150). M. Kolle insiste au contraire sur l'importance de la virulence de la culture employée, dans l'appréciation des résultats.

Le sérum des sujets sains agglutine parfois nettement, quoique faiblement, le bacille d'Eberth. D'autre part, quelques auteurs ont cru pouvoir établir un rapport entre le titre du pouvoir agglutinant et la gravité de l'affection. Il est donc important, non seulement de rechercher la réaction, mais encore de mesurer son *intensité*. On étudiera comparativement le pouvoir agglutinant avec des dilutions au 1/10e, au 1/20e, au 1/50e, au 1/100e, au 1/500e, au 1/1 000e, etc. L'agglutination est parfois si énergique que la réaction demeure encore positive avec des dilutions à 1/5 000 et même à 1/10 000. Pratiquement, lorsqu'on ne dispose que d'une petite quantité de sérum, ce qui arrive par exemple avec le sang desséché sur papier, on peut se contenter de deux dilutions, l'une à 1/10 et l'autre à 1/50. Cette dernière est exigée par M. Remy pour poser le diagnostic de fièvre typhoïde.

Importance du sérodiagnostic. — La recherche de la réaction agglutinante constitue le *seul moyen* vraiment *pratique* de diagnostiquer la dothiénentérie. Très rapide, très facile à mettre en œuvre, elle doit être préférée à tout autre procédé d'investigation et c'est seulement lorsque les résultats

seront en désaccord formel avec la clinique qu'on devra y joindre de toute nécessité la recherche du b. typhique dans les selles, le sang, l'urine et même la pulpe splénique. Il faut savoir que la propriété agglutinante n'apparaît dans le sang que du 6e au 10e jour. Il existe, de plus, des « sérodiagnostics retardés », où la réaction n'est positive qu'à une période très éloignée de la maladie. On ne s'en tiendra donc pas à un premier résultat négatif et *on recommencera l'épreuve* à différentes reprises. Dans quelques cas, très rares il est vrai, où la réaction agglutinante faisait totalement défaut, l'autopsie a démontré l'existence d'une dothiénentérie. Ces faits ont été surtout signalés dans des *formes très graves*, alors que la présence du b. d'Eberth avait été décelée dans le sang ou la pulpe splénique (Kölzer). Inversement, on a vu des sérums normaux ou des sérums de malades non atteints de dothiénentérie agglutiner le bacille d'Eberth dans la proportion de 1/10, 1/15 et même 1/20. Ces faits, exceptionnels eux aussi, ne sont pas de nature à diminuer la grande importance pratique du sérodiagnostic. Mentionnons, en terminant, que la propriété agglutinante persiste dans le sang un temps très variable mais parfois fort long; l'épreuve de Widal est donc applicable au *diagnostic rétrospectif*.

Séropronostic. — Pour quelques auteurs, le sérodiagnostic pourrait se doubler d'un séropronostic. M. P. Courmont mesure chaque jour le degré d'agglutination, en ajoutant une goutte de sérum à un nombre variable (10, 20, 50, 100, 200, etc.) de gouttes d'une culture jeune de b. d'Eberth. Il établit ainsi la courbe du pouvoir agglutinant, pouvoir qu'il considère, contrairement à l'opinion générale, comme un indice de la défense de l'organisme. Un pouvoir agglutinant élevé est donc pour lui d'un bon pronostic, un pouvoir agglutinant faible d'un fâcheux présage. Une courbe

en clocher, s'élevant à la fin du 2e septenaire, quand la température commence à baisser, serait d'un bon pronostic; une courbe descendant pendant la 2e période, de mauvais augure. Une courbe basse, coïncidant avec des températures élevées, indiquerait une forme grave et prolongée ; une courbe basse, coïncidant avec des températures également basses, ne comporterait pas un pronostic défavorable, mais ferait craindre une rechute. La *majorité des auteurs* sont d'avis que le pouvoir agglutinant est très variable d'un jour à l'autre, sans qu'on en démêle bien les raisons et ils ne croient pas que, de telles oscillations, on puisse tirer un élément pronostique. D'après M. Rouget, les complications de la convalescence seraient annoncées, en général, par une élévation du pouvoir agglutinant.

6° *Urodiagnostic.*

Quelques auteurs (Bormans, Beniasch) ont conseillé d'utiliser, pour le diagnostic de la fièvre typhoïde, les propriétés agglutinantes, non plus du sang, mais de l'urine. A 1 centimètre cube d'urine, on ajoute 2 centimètres cubes d'une culture jeune de bacille d'Eberth et on porte à 37°. Au bout de 2 à 3 heures, on voit des grumeaux se former. Lorsque la réaction est étudiée dans ces conditions, l'urine n'a pas besoin d'avoir été recueillie purement. Pour rechercher l'agglutination à l'état naissant, on la prélèvera au contraire aseptiquement et on la mélangera à parties égales avec la culture, puis on portera à l'étuve pendant 24 heures. La réaction serait plus nette dans cette seconde épreuve. Toutefois, les propriétés agglutinantes de l'urine sont fort inconstantes et l'urodiagnostic n'est pas entré dans la pratique.

B. Diagnostic sur le cadavre

On aura l'occasion de le réaliser lorsque les ulcérations intestinales seront peu caractéristiques, discrètes, ou même manqueront complètement (fièvre typhoïde sans dothiénentérie). On prélèvera un peu de pulpe splénique et on en fera des frottis, qu'on colorera à la thionine. Le bacille d'Eberth se présente le plus souvent, dans la rate, sous forme d'*amas* ; on s'assurera que ces amas se décolorent par la méthode de Gram. Des ensemencements seront également pratiqués en bouillon, en bouillon additionné de typhussérum (Remlinger) et sur les divers milieux nutritifs que nous avons indiqués. Si l'autopsie est faite longtemps après la mort et si on a lieu de craindre l'envahissement des organes par le b. coli, une dilution de pulpe splénique dans de l'eau stérilisée servira à ensemencer des plaques au milieu d'Elsner ou à la gélatine de Rémy. On prélèvera aussi un fragment de rate, qui sera fixé au sublimé, inclus dans la paraffine et débité en coupes. On colorera celles-ci au bleu de méthylène ou à la thionine : l'aspect des amas bacillaires est tout à fait caractéristique.

IV. *Vaccination antityphique.*

M. Wright a mis en œuvre, pour la fièvre typhoïde, une méthode préventive analogue à celles qu'emploie M. Haffkine vis-à-vis du choléra et de la peste. Les résultats semblent encourageants, mais il est encore impossible de se prononcer définitivement à l'heure actuelle.

Pour terminer ce qui a trait à la dothiénentérie, nous mentionnerons l'emploi de l'*urotropine*, desti-

née à faire disparaître le bacille d'Eberth des urines, lorsqu'il s'y montre abondant et persistant (bactériurie typhique) et qu'il constitue ainsi une cause très redoutable de contamination du milieu extérieur. On donnera environ 2 grammes par jour et on fera bien de continuer jusqu'à la quatrième semaine de la convalescence (Richardson, Horton Smith).

AFFECTIONS HUMAINES DUES AUX COLIBACILLES

I. *Principaux caractères du colibacille type.*

Caractères morphologiques.

Les caractères morphologiques du b. coli (fig. 142) sont presque identiques à ceux du b. d'Eberth. Toutefois le b. coli est un peu moins mobile, ce qui tient au nombre moins grand de ses cils vibratiles (6-10 au lieu de 10-12 — Nicolle et Morax). Comme le b. d'Eberth, le b. coli se colore avec toutes les couleurs basiques d'aniline et ne prend pas le Gram. Il ne donne point non plus de spores.



Fig. 142. — Bactérium coli (ou bacille d'Escherich). Culture en bouillon d'après Besson.

Caractères de culture.

Il se développe rapidement dans le bouillon, en le troublant fortement. Il forme à la surface, après un

ou deux jours, une pellicule unie et une collerette adhérente au verre. Les vieilles cultures présentent une coloration brunâtre et exhalent une odeur fétide. Sur gélose, il donne en 24 heures un enduit blanc, luisant, humide et épais. Il se développe dans la gélatine sans la liquéfier. En plaques, les colonies commencent à apparaître après 36 heures. Les colonies profondes sont rondes ou ovales ; au microscope, elles montrent une coloration jaune brunâtre et paraissent formées de fines granulations. Les colonies superficielles sont tantôt épaisses, humides et blanches, tantôt sèches et transparentes. Elles affectent volontiers une configuration tourmentée, qui les a fait comparer à des îles de glace et présentent souvent une élevure plus ou moins excentrique. Par piqûre, le b. coli pousse aussi bien en surface qu'en profondeur ; son développement s'accompagne parfois du dégagement de bulles de gaz. En strie, il forme une couche blanc bleuâtre, beaucoup plus épaisse que celle du b. typhique. Sur pomme de terre, le développement est abondant ; c'est un enduit épais, grisâtre, brunissant tantôt dès le début, tantôt après quelques jours. Sur tranches d'artichaut et sur gélose au jus d'artichaut, on observe une coloration vert émeraude. Le lait se coagule en 24, 36, 48 heures, souvent plus tardivement encore. La coagulation ne s'opère parfois (Etienne) que si le milieu nutritif est réparti en couche mince. Le b. coli se développe fort bien en milieu Fränkel.

Caractères biologiques.

Le b. d'Escherich est à la fois aérobie et anaérobie. Il fait fermenter le saccharose ; le glucose (lorsqu'on l'ensemence, par piqûre en couche haute, dans de la

gélose glucosée à 2 pour 100, on assiste à la formation de bulles de gaz); le lactose (les tubes de bouillon, additionnés de 3 pour 100 de lactose et d'un peu de carbonate de chaux, présentent, en 24 heures, à leur surface une collerette de fines bulles de gaz, indice de la fermentation). Il donne de l'indol (cultiver, de préférence, dans de l'eau peptonisée à 2 pour 100). Il se développe sur la gélose ou la gélatine, sur lesquelles le b. d'Eberth ou lui-même ont poussé antérieurement. Enfin, il croît dans le bouillon contenant 1^{gr}, 50 d'acide arsénieux par litre (Thoinot et Brouardel).

Le sérum humain normal agglutine le colibacille à 1/10 et même à 1/20. Il en est de même du sérum d'un certain nombre d'animaux, en particulier du cobaye adulte. Le sérum du cobaye nouveau-né ne déterminerait par contre aucune agglutination (Kraus). Dans les affections provoquées par les colibacilles on observe assez souvent un pouvoir agglutinant élevé, mais celui-ci reste d'ordinaire limité au colibacille, du malade même ; les autres échantillons ne sont généralement pas influencés. Pareillement, si on inocule plusieurs cobayes avec les colibacilles isolés de différents malades, le sérum de chaque cobaye agglutine le colibacille correspondant, mais pas forcément les autres. Il s'ensuit que la réaction agglutinante est loin d'avoir, pour diagnostic des affections colibacillaires, l'importance qu'elle a pour celui de la fièvre typhoïde.

Caractères d'inoculation.

On rencontre la plus grande variété dans la virulence des divers échantillons de colibacille. Le b. coli des selles normales, un grand nombre d'échantillons

isolés de l'eau, du sol, des poussières sont, le plus souvent, complètement inactifs. Dans les cas heureux, l'inoculation du b. coli détermine une septicémie expérimentale, dont les rapports avec les différentes affections causées chez l'homme par ce micro-organisme demeurent très lointains. L'animal de choix est le cobaye. L'injection intrapéritonéale d'un centimètre cube de culture jeune en bouillon amène souvent la mort en 2 ou 3 jours. Les émulsions de gélose peuvent tuer en une douzaine d'heures, si la dose et la virulence sont suffisantes. On constate, à l'autopsie, la présence d'un exsudat péritonéal, riche en coli-bacilles. Le péritoine est rosé; l'intestin grêle hyperhémié contient un liquide muqueux; les plaques de Peyer sont légèrement épaissies. La rate est normale ou faiblement hypertrophiée; il n'existe pas de lésions viscérales. On retrouve le bacille dans le sang et les organes. La voie intrapleurale constitue également un bon procédé d'inoculation; à l'autopsie, on rencontre une pleurésie, souvent hémorragique, avec dépôts fibrineux sur les poumons. Le bacille se généralise ici encore.

La souris est habituellement très sensible. L'inoculation intra-abdominale est suivie de péritonite, de pleurésie et d'envahissement septicémique.

Le lapin est moins réceptif. L'injection de doses massives, dans le péritoine ou la plèvre, produit cependant des désordres analogues à ceux qu'on observe chez le cobaye et la souris. L'injection sous-cutanée se montre souvent pyogène; la mort survient au bout d'un temps assez long et on trouve des abcès au point d'inoculation, dans les séreuses, le foie, les ganglions, etc. Lorsque la maladie prend ainsi une forme chronique, il n'est pas rare d'assister au développement de paralysies.

II. *Caractères différentiels entre le b. typhique et le b. coli type*

Il résulte, des caractères que nous avons assignés au b. d'Eberth et au b. coli, que ces deux organismes affectent d'étroites ressemblances et qu'un diagnostic différentiel rigoureux s'impose dans bien des cas. Nous résumerons ici les principaux éléments de ce diagnostic.

1° Le B. C. est moins mobile que le B. T. Ses cils (généralement 6-10) sont plus fragiles. Leur nombre varie beaucoup d'un B. C. à un autre, et d'un individu à un autre, dans une même préparation. C'est ordinairement le contraire pour le B. T.

2° Le B. C. se développe plus vite et plus abondamment dans tous les milieux de culture. Dans le bouillon, il dégage une odeur fétide spéciale; sur pomme de terre, il donne une couche épaisse ; en plaques de gélatine, les colonies superficielles offrent bien plus souvent l'aspect en îles de glace que les colonies de B. T. Celui-ci cultive à peine sur pomme de terre et ne dégage pas d'odeur dans le bouillon.

3° Le B. C. produit de l'indol dans l'eau peptonisée ; il coagule le lait; il donne lieu à un dégagement de gaz dans l'eau peptonisée lactosée et dans la gélose glucosée, ensemensée, par piqûre, en couche profonde. Il ne se produit rien de tel dans le cas du B. T.

4° Le B. C. se développe dans le milieu Fränkel. Le B. T. n'y donne pas de culture appréciable.

5° Le B. C. pousse sur les cultures grattées (gélose) et dans les cultures filtrées (bouillon) du B. T. L'inverse n'a pas lieu.

6° Le B. C. n'est pas agglutiné par le typhus-sérum. Le B. T. n'est pas agglutiné par le coli-sérum.

7° Le typhus-sérum ne préserve pas contre l'infection par le B. C. Le coli-sérum ne préserve pas contre l'infection par le B. T.

8° Le B. C. supporte un grand nombre d'additions (aux milieux de culture) que le B. T. ne tolère pas. Par exemple, le B. T. ne pousse pas dans le bouillon additionné de plus de $0^{gr},01$ d'acide arsénieux par litre. Le B. C. pousse d'emblée dans un boullion additionné de 1,50/1 000 d'acide arsénieux et il peut être entraîné à pousser dans des milieux plus arséniés.

Mentionnons encore les caractères différentiels suivants, dont nous n'avons pas contrôlé la valeur.

9°) La réaction de la créatinine (Salkowsky), positive avec le B. C., reste négative avec le B. T. On additionne une culture de colibacille (en eau peptonisée à 2 pour 100) de quelques gouttes de carbonate de soude, puis de quelques gouttes d'une solution fraîche de nitroprussiate de soude. On obtient une coloration rouge, puis jaune. Si l'on ajoute de l'acide acétique, la teinte passe au vert, puis au bleu. La coloration disparaît par addition d'ammoniaque.

10° Les réactions suivantes, dues à M. Orlowski, pourraient servir aussi au diagnostic différentiel (il s'agit toujours d'ensemencements par piqûre).

a) Si on ensemence le B. T. dans de la gélatine additionnée de 3 pour 100 de tartrate de fer, on obtient, dès le 2[e] jour, une coloration noire le long de la piqûre. Avec le B. C. la coloration noire n'apparaît que du 10[e] au 12[e] jour et elle se montre seulement à l'extrémité de la piqûre.

b) Le B. T. ensemencé dans la gélatine au nitroprussiate de soude donne une faible coloration bleue

à l'extrémité de la piqûre. Le B. C. fournit une coloration bleue très intense.

c) En gélatine additionnée d'acétate basique de plomb, on obtient dans le cas du B. T. une coloration noire très marquée dès le 2° jour ; dans le cas du B. C. une teinte très faible et plus tardive.

Le B. T. dégage donc plus facilement de l'H^2S en présence des sels de fer et de plomb ; le B. C. plus facilement en présence du nitroprussiate ;

11° Dans le liquide n° 1 de Capaldi et Proskauer (dont on trouvera la formule à la fin du volume), neutralisé avec de la soude jusqu'à coloration rouge violet au tournesol, le B. C. pousse et donne des acides. Le B. T. ne s'y développe pas de façon appréciable; aussi, ne se produit-il aucun changement de réaction.

Dans le liquide n° 2 des mêmes auteurs, neutralisé avec de l'acide citrique jusqu'à coloration rouge violet, le B. C. et le B. T. poussent après 20 heures. Le premier alcalinise et le second acidifie.

III. *Principales variétés du coli bacille.*

Le diagnostic différentiel du B. coli et du B. typhique se complique, pratiquement, du fait des nombreuses variétes du B. d'Escherich. Celles-ci constituent, entre le B. d'Eberth type et le B. coli type, une chaîne pour ainsi dire ininterrompue d'intermédiaires. L'un de nous a groupé les principales variétés connues, dans le tableau suivant, basé sur ses documents personnels et sur les recherches de divers auteurs (Gilbert, Refik-bey, etc.).

		Fermentation des sucres	Coagulation du lait	Production d'indol	Mobilité	N° d'ordre
Colibacilles trouvés dans les eaux.	Coli type. . .	+	+	+	+	(1)
	1re variété. . .	+	—	+	+	(2)
	2e — . . .	+	—	—	+	(3)
	3e — . . .	—	+	—	+	(4)
	4e — . . .	—	—	—	+	(5)
Colibacilles trouvés dans l'intestin.	Coli type. . .	+	+	+	+	(1)
	1re variété. . .	+	+	+	—	(6)
	2e — . . .	+	+	—	+	(7)
	3e — . . .	+	+	—	—	(8)
	4e — . . .	—	—	—	—	(9)
Colibacille de l'endocardite. . . (Gilbert et Lion).		+	+	+	—	(6)
Colibacille de l'infection urinaire. (Achard et Renaut).		+	+	—	+	(7)
Colibacille de l'entérite folliculaire des enfants. (Finkelstein).		+	+	+	+	(1)
Bacillus fœcalis alcaligenes. . . (Petruschky).		—	—	—	+	(5)

IV. *Habitat et rôle pathogène des colibacilles.*

Le colibacille se trouve pour ainsi dire partout. Il acquiert des adaptations diverses et peut pénétrer dans l'organisme de bien des manières. Les conditions dans lesquelles on pourra avoir à le rechercher sont nécessairement très nombreuses. Le tableau suivant en donne une idée.

Habitat. — Les colibacilles ont été rencontrés dans tout le tube digestif et dans l'urètre des gens sains. Ils sont répandus dans l'eau, le sol, l'air, etc.

Affections dues aux colibacilles. — *App. circu-*

latoire. — Endocardites (b. de Gilbert et Lion ; b. de l'endocardite de Weichselbaum). Phlébites.

App. respiratoire. — Broncho-pneumonies. Pleurésies (purulentes). Thyroïdites.

App. digestif. — Angines. Entérites des nourrissons (ent. folliculaire de Finkelstein). Choléras infantile et nostras. Péritonites (avec ou sans perforation). Chloléra herniaire. Abcès sous-phréniques. Angiocholites (suppurées). Abcès du foie. Lithiase biliaire. Ictères graves (hypothermiques). Maladie de Weill.

App. génito-urinaire. — Infection urinaire (les C. B. en sont les agents les plus fréquents). Cystites. Salpingites (purulentes). Infection puerpérale (certains cas).

Système nerveux. — Méningites.

Système locomoteur. — Arthrites.

Système tégumentaire. — Phlegmons.

[Ne pas oublier que les colibacilles se généralisent fréquemment après la mort (organes, sang, bile)].

COLIBACILLES COMME AGENTS D'INFECTIONS SECONDAIRES. — Fièvre typhoïde, choléra, etc...

V. *Diagnostic bactériologique des affections à colibacilles.*

De cette liste d'affections si disparates, il résulte naturellement que les procédés à mettre en œuvre pour assurer le diagnostic varient beaucoup suivant les cas. Souvent, on fera, à l'aide de ponctions, des prélèvements qui seront ensemencés dans les divers milieux nutritifs. Ces prélèvements pourront porter sur du sang, du pus, du liquide articulaire, du suc pulmonaire, etc. ; ailleurs c'est un exsudat pharyngien ou une urine qui seront ensemencés. D'autres fois (choléra infantile, choléra nostras, etc...) on fera des plaques en gélatine ou en milieu d'Elsner avec des selles diluées

dans de l'eau stérilisée. Une cause d'erreur qu'il est à peine besoin de signaler est la présence du colibacille, dans l'intestin, à l'état normal. Le nombre des colonies obtenues pourra avoir son importance, pour apprécier le rôle pathogène du micro-organisme isolé ; toutefois, on se souviendra que la teneur de l'intestin en colibacilles est extrêmement variable. Chez un même individu, elle se modifie suivant une foule de circonstances. Quelque fragiles que soient les notions que nous possédons sur l'*agglutination* du colibacille, on pourra peut-être tirer quelques indices diagnostiques de l'influence du sérum du malade sur le b. coli isolé de son organisme. On pourra, aussi, dans une certaine mesure, se baser sur la virulence. *Aux autopsies,* le diagnostic se heurte à des difficultés presque insurmontables, tirées de la généralisation rapide du bacille après la mort. Nous avons vu que ce microbe apparaissait tout d'abord dans le foie. On ne négligera donc jamais de faire, avec la pulpe hépatique, des ensemencements comparatifs. Si ces ensemencements fournissent un résultat positif, la plus grande réserve s'imposera.

DIPHTÉRIE

I. *Principaux caractères du bacille de Löffler.*

Le bacille de Löffler (fig. 143) est l'agent pathogène de la diphtérie, quel que soit son siège (diphtérie pharyngée, oculaire, nasale, cutanée, etc.). Il n'est pas rare dans le nez, la bouche et la gorge des personnes saines, qu'elles aient été ou non en rapport avec des diphtéritiques. M. Kober l'a isolé chez 8 pour 100 des sujets dans le premier cas, chez 2,5 pour 100 dans le second (il faut noter toutefois que, dans ce second cas, 10 échantillons sur 15 se sont montrés avirulents). Il a été rencontré sur l'escarre consécutive à l'ablation galvanocaustique des amygdales (Lichtwitz), dans un empyème à pneumocoques et dans la sérosité louche de certains panaris (Han). Enfin il serait assez fréquent, d'après M. Grignon, dans la gorge des animaux.



Fig. 143. — Bacille de Löffler.

Caractères morphologiques.

Dans les fausses membranes, le b. diphtéritique se

présente sous la forme de bâtonnets à bouts arrondis et un peu amincis, tantôt droits, tantôt légèrement recourbés. Parfois, les bacilles se renflent en poire ou en massue à une de leurs extrémités ; ailleurs, on les trouve granuleux et irrégulièrement teintés. Ils sont souvent groupés parallèlement, ou disposés en V. Dans les cultures jeunes, l'aspect est le même. Les bacilles se montrent cependant plus petits que dans les fausses membranes. Dans les cultures âgées, les formes d'involution sont habituelles ; c'est ainsi qu'on trouve des bactéries fusiformes, des coccus volumineux, etc.

On distingue, dans les fausses membranes et les cultures, *trois types* de bacilles diphtéritiques, les uns courts, les autres moyens, d'autres longs. Les bacilles longs sont d'ordinaire enchevêtrés ; ils correspondent en général aux angines les plus toxiques. Les bacilles moyens et courts se disposent fréquemment en séries parallèles. MM. Babès, Klein, Fränkel, Bernheim, Folger et Meyerhof ont décrit des formes ramifiées. Elles sont surtout fréquentes dans les cultures sur albumine coagulée, où elles coïncident avec des formes d'involution variées ; elles sont plus rares sur sérum et sur gélose, exceptionnelles en bouillon. Le b. de Löffler est immobile ; il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et par la méthode de Gram.

Caractères de culture.

Suivant que la viande employée est fraîche, plus ancienne, ou encore qu'elle dégage une légère odeur de putréfaction, on peut avoir, en bouillon, *trois aspects* différents. Dans le bouillon préparé avec de la viande fraîche, la culture devient rapidement acide. Les bacilles se développent sous forme de petits grumeaux, fixés à la paroi, puis ces grumeaux se rassem-

blent au fond du tube en une couche blanchâtre. Lorsque la culture est laissée au repos, un voile très mince apparaît, après quelque temps, à la surface du liquide ; l'acidité dure indéfiniment. Si la viande employée commençait à se putréfier, la culture ne s'acidifie pas, mais devient au contraire de plus en plus alcaline. Le développement est luxuriant, un voile épais se forme à la surface et le liquide ne se clarifie jamais. Enfin, si on a utilisé une viande ancienne, mais non encore putréfiée, le bouillon, primitivement acide, s'alcalinise ensuite ; la culture, d'abord claire, se trouble, et on voit apparaître un voile superficiel assez dense (Spronck).

Sur sérum coagulé, les colonies de b. de Löffler se présentent sous forme de taches blanches, arrondies, plus épaisses au centre qu'à la périphérie, à contours réguliers. D'après M. Nocard, les colonies, blanches sur sérum de cheval, deviennent plus ou moins jaunâtres sur sérum de bœuf.

La croissance n'est pas aussi rapide sur gélose ; le bacille de Löffler y forme de petites taches blanches, plus épaisses au centre, nullement caractéristiques. On n'observe pas de culture sur pomme de terre. Le développement est très lent sur gélatine. Le lait constitue un milieu fort médiocre, surtout s'il a été chauffé (Schottelius).

Caractères biologiques.

Le b. de Löffler est presque exclusivement aérobie ; il se développe très mal dans le vide et la culture demeure acide (Roux et Yersin). Il ne pousse ni aux basses températures, ni au-dessus de 40°. L'optimum thermique est de 37°. Déjà, à 20-22°, la croissance se montre très pénible. Enfin, il se laisse agglutiner, bien que faiblement et irrégulièrement, par le sérum

antidiphtérique et par le sérum des malades qui ont reçu de l'antitoxine. Le sérum des diphtériques non injectés n'agglutine pas. Le sérodiagnostic n'est donc pas applicable dans l'espèce (Nicolas).

Caractères d'inoculation.

Cobaye. — Inoculé sous la peau, il meurt en 36 heures environ ; à l'autopsie, on trouve, au point inoculé, un enduit membraneux grisâtre et un œdème gélatineux plus ou moins étendu. Il existe de la congestion viscérale, surtout marquée au niveau des ganglions et des capsules surrénales. L'épanchement pleural est très fréquent et les poumons présentent quelquefois de la splénisation. On ne retrouve de bacilles qu'au point d'inoculation et ils y sont toujours peu abondants. L'inoculation intrapéritonéale tue moins vite ; la mort ne survient qu'en 3 à 4 jours. Si on cautérise légèrement, avec une baguette de verre chauffée, la vulve et l'entrée du vagin et qu'on ensemence sur la plaie un b. de Löffler suffisamment actif, on observe, après quelques heures, de la rougeur et du gonflement, puis apparaissent des fausses membranes grisâtres et adhérentes. La fièvre survient et, au bout de 2 ou 3 jours, le cobaye meurt très amaigri.

Lapin. — Par injection intraveineuse le lapin meurt en 72 heures environ. L'autopsie montre une congestion généralisée, de la tuméfaction des ganglions, des lésions de néphrite aiguë et souvent de la dégénérescence graisseuse du foie. Si la mort n'est pas aussi rapide, on observe des paralysies, au bout de quelques jours. A la suite de l'injection sous-cutanée, la mort est plus lente que chez le cobaye. On note, pendant la vie, de l'œdème local, de la tristesse, de l'anorexie. Au point d'inoculation, on retrouve, *post*

mortem, l'œdème, accompagné d'un piqueté hémorragique. Les ganglions inguinaux et axillaires sont tuméfiés, le péritoine congestionné et ecchymosé ; le foie est jaune, friable ; les poumons restent généralement sains. On obtient de belles fausses membranes en infectant la peau de la face interne de l'oreille, préalablement dénudée au moyen d'un vésicatoire. La voie trachéale est également utilisable ; on produit ainsi un véritable croup et l'animal succombe au bout de 3 à 5 jours.

Chien. — Il se montre très réceptif. L'inoculation sous la peau donne une tuméfaction locale, de la stupeur, de l'ictère et une paralysie généralisée ; l'animal succombe en 3 jours. Les effets de l'injection intratrachéale sont très analogues ; il n'y a pas production de fausses membranes, mais on observe de la prostration, des paralysies, de l'ictère et la mort arrive généralement en 4 jours.

Pigeon. — Inoculé sous la peau, il meurt rapidement. On observe, au point inoculé, un enduit grisâtre et un œdème gélatineux. Les viscères sont congestionnés, le sang noir et mal coagulé. L'inoculation sur la muqueuse trachéale, préalablement excoriée, amène, au bout de 3 semaines, une forme de paralysie très particulière ; les animaux tombent constamment et il leur est impossible de se relever. Généralement la maladie s'améliore et la guérison survient au bout de 5 semaines environ. Quand les pigeons succombent, l'autopsie reste négative. Les *petits oiseaux* sont également réceptifs. MM. Simonin et Benoît ont signalé le calfat (bouvreuil des Indes) comme particulièrement sensible et pouvant constituer un excellent réactif expérimental.

Le *cheval* est assez résistant pour bien se prêter, comme nous le savons, à la préparation de l'antitoxine. Le *rat* et la *souris* sont réfractaires.

II. *Bacille pseudo-diphtérique.*

Avant de passer au diagnostic bactériologique de la diphtérie, nous devons dire un mot du bacille pseudo-diphtérique, ou *b. de Hoffmann*, avec lequel on est exposé à confondre le b. de Löffler.

Le bacille pseudo-diphtérique se rencontre dans le pharynx et le nez des gens sains, des rubéoliques, des scarlatineux..., etc. On peut le rencontrer aussi dans la diphtérie, à côté du bacille de Löffler. Très analogue à lui au point de vue morphologique, bien qu'un peu plus court, il en diffère en ce que sa culture se montre plus abondante sur tous les milieux nutritifs. Il se développe aussi à une plus basse température. Il pousse plus facilement sur gélose et continue à croître quand il est retiré de l'étuve. Il se développe moins abondamment dans le vide et acidifie moins longtemps le bouillon. Sur sérum, les colonies sont plus plates, plus riches, moins opaques que celles du b. de Löffler. Sur pomme de terre, il fournit un dépôt gris sale (Veillon). Il ne tue jamais le cobaye, auquel il donne parfois un peu d'œdème, mais le plus souvent rien du tout.

M. Spronck a proposé, pour distinguer les deux microbes, de recourir à l'action du sérum antitoxique, lequel ne protège pas contre l'œdème insignifiant dû au b. pseudo-diphtérique, tandis qu'il empêche non seulement la mort, mais même l'apparition de toute lésion locale, lorsqu'on l'injecte avant le b. de Löffler. Toutefois M. Fränkel a montré que l'œdème ne suit pas constamment l'inoculation du b. de Hoffmann ; il y a, en effet, des différences individuelles de la part des animaux et des différences individuelles de la part des bacilles. Le criterium de Spronck laissera donc souvent dans le doute. M. Martin a fait voir que cer-

tains bacilles, avirulents pour le cobaye, tuent parfaitement le moineau, plus sensible ; pareille constatation a été faite, pour le calfat, par MM. Simonin et Benoît ; dans ces cas, la nature de l'organisme suspect ne saurait être discutée. M. Martin a établi, en outre, que des bacilles avirulents peuvent engendrer une toxine active, dont la spécificité est prouvée par l'influence du sérum. Enfin, M. Neisser, en employant la méthode de Ernst, a vu que le b. pseudo-diphtérique se colore en brun homogène, tandis que le b. diphtérique présente, sur ce fond brun, des granulations bleu foncé. La valeur diagnostique de cette réaction est malheureusement contestée par la plupart des auteurs. Pour la pratiquer, au cas échéant, on s'adressera à des émulsions de cultures jeunes sur sérum et on les traitera d'abord par le bleu de méthylène acétisé, puis par le brun de Bismark aqueux.

Il semble bien que le bacille de Hoffmann doive être considéré comme *un bacille de Löffler avirulent.*

III. *Principaux organismes pouvant se rencontrer avec le bacille de Löffler.*

Nous devons signaler ici les principaux microbes auxquels le b. de Löffler peut être associé dans les fausses membranes : coccus Brisou, streptocoque, staphylocoque, pneumocoque, colibacille, bacille de Friedländer.

Le *coccus Brisou* est un petit organisme qui résiste au Gram et qui, associé au b. de Löffler, donne des diphtéries bénignes. Les colonies sur sérum rappellent beaucoup celles du b. de Löffler, mais elles sont moins saillantes, presque transparentes, et leur centre ne s'épaissit pas. Le coccus Brisou n'est point pathogène pour les animaux (Roux et Martin).

L'*association streptococcique* constitue au contraire

un facteur de gravité. Des lapins, inoculés dans la trachée avec un streptocoque atténué et un b. de Löffler virulent, succombent à une infection à marche rapide ; à l'autopsie, on trouve des foyers broncho-pneumoniques, dans lesquels les deux microbes se sont développés abondamment ; le streptocoque s'est généralisé dans tous les organes (Roux et Yersin). Les lapins ainsi inoculés ne peuvent être sauvés que par des injections de sérum fréquemment répétées et commencées au plus tard 8 heures après l'inoculation (Roux et Martin). Ces expériences doivent être toujours présentes à l'esprit du clinicien.

Le *staphylocoque*, le *pneumocoque*, le *b. coli*, le *b. de Friedländer* augmentent la virulence du b. de Löffler, mais dans des proportions moindres que le streptocoque.

IV. *Diagnostic bactériologique de la diphtérie.*

A. Diagnostic sur le vivant.

Manière de recueillir les produits pathologiques. — Aujourd'hui, les laboratoires spéciaux envoient aux médecins des *nécessaires* tout prêts pour la récolte des produits diphtériques. Le nécessaire construit sur les indications de M. Miquel peut être pris comme type. Il comprend : 1° un tube stérile, destiné à recevoir les fausses membranes ; 2° deux tampons d'ouate hydrophile, montés sur des tiges de cuivre argenté et enfermés dans des tubes de verre ; ces tampons servent à détacher les fausses membranes pharyngées ou nasales et, en l'absence de celles-ci, à recueillir les mucosités suspectes ; la tige du tampon destinée au pharynx est plus longue que celle du tampon destiné aux fosses nasales ; 3° deux tubes de sérum coagulé ; 4° une spatule de cuivre ar-

genté, pour faire les ensemencements au lit du malade.

Le médecin, pourvu d'un nécessaire, se comportera comme il suit. S'il existe des fausses membranes, il les ensemencera à l'aide de la spatule, préalablement stérilisée dans la flamme d'une lampe à alcool, puis refroidie. Pour cela, il touchera la surface des fausses membranes avec l'extrémité de la spatule (en grattant très légèrement), puis il « essuiera » pour ainsi dire l'instrument à la surface des deux tubes de sérum, sans recharger et sans entamer la surface du milieu nutritif. Enfin, il détachera un fragment de fausse membrane à l'aide d'un des tampons et le placera dans le tube destiné à le contenir. S'il n'existe pas de fausses membranes, le médecin ensemencera les mucosités suspectes et en recueillera également un échantillon avec un des tampons. Dans les deux cas, le nécessaire sera renvoyé *immédiatement* au laboratoire.

Si le médecin ne possède pas de nécessaire, il se bornera à prélever les produits pathologiques aussi aseptiquement que possible. Il détachera les fausses membranes avec une pince flambée, ou en les frottant avec un petit carré de toile, stérilisé dans l'eau bouillante, puis refroidi, et les placera dans un récipient quelconque, stérilisé aussi à l'eau bouillante et refroidi. Les mucosités seront également recueillies avec un carré de toile. Dans tous les cas, il faut éviter soigneusement d'envelopper les fausses membranes dans du taffetas gommé ou ciré, ou de les mettre dans des flacons ayant contenu de l'acide phénique, des essences, de la glycérine..., etc. (Miquel). Le médecin ne doit prélever les produits suspects que plusieurs heures après l'application locale d'un antiseptique, sous peine de rendre l'examen bactériologique tout à fait illusoire.

Marche de l'analyse. — Les produits sont d'abord ensemencés, puis examinés au microscope.

Ensemencement. — Il n'est pas nécessaire, s'il s'agit de fausses membranes types, que le médecin a convenablement ensemencées lui-même sur le sérum fourni par le laboratoire. Dans tous les autres cas, il est indispensable. Si les fausses membranes arrivent desséchées, on les ramollira d'abord dans l'eau stérilisée. On ensemencera, avec le même soin, les mucosités qui recouvrent les tampons ; puis, par précaution, on lavera ceux-ci dans 5 centimètres cubes d'eau stérilisée. Le liquide de lavage sera versé sur une plaque de sérum coagulé et enlevé après 5 minutes de contact. Ce second ensemencement constitue une excellente précaution, car la dilution rend moins dangereuses les substances antiseptiques qui auraient pu rester à la surface des mucosités (Miquel). Souvent, on ne reçoit pour tout produit que divers débris plus ou moins méconnaissables ; on se bornera à les ensemencer.

Les infections associées ayant une grande importance pour le pronostic, on ensemencera parallèlement aux tubes de sérum deux tubes de gélose et, le lendemain, on appréciera la nature et le nombre des colonies non diphtéritiques développées.

Examen microscopique. — Étaler les fausses membranes, mucosités..., etc., sur une ou deux lames. Fixer et colorer par le Gram-éosine. Chercher les bacilles, colorés en violet, qui répondent à la description classique : bacilles tantôt effilés, tantôt un peu renflés aux extrémités ; enchevêtrés, en paquets, ou en V ; entremêlés parfois de formes d'involution..., etc.

L'attention se portera aussi sur les microbes auxquels le bacille de Löffler peut être associé dans la fausse membrane ; on fera donc une seconde préparation, à l'aide de la méthode directe, afin de

rechercher les organismes qui ne prennent pas le Gram.

L'examen microscopique laisse souvent dans le doute, soit que les bacilles rencontrés se montrent très rares, soit qu'ils restent peu caractéristiques. Pratiquement, il ne doit donc être considéré que comme donnant une probabilité plus ou moins grande. Il ne saurait dispenser des cultures et doit toujours passer après celles-ci.

Examen des cultures. — Sur un bon sérum, les colonies apparaissent déjà après 8 à 16 heures à 37°. On les rencontrera presque toujours après 20 heures, à moins que le sérum ne soit vraiment mauvais, ou qu'il ne s'agisse de bacilles altérés par les antiseptiques. En présence d'un résultat négatif, on laissera encore pendant 1 jour les tubes à l'étuve.

Les colonies diphtéritiques se reconnaîtront à leurs caractères classiques : petits disques arrondis, plus épais au centre, à contours réguliers..., etc. On les distinguera ainsi du coccus Brisou, du streptocoque, du staphylocoque, etc. L'examen microscopique permettra d'ailleurs, le plus souvent, un diagnostic facile. S'il restait des doutes, on pourrait recourir à la culture sur les divers milieux ou même à l'inoculation.

Inoculation. — Elle n'est indiquée que lorsqu'on veut connaître le degré d'activité des bacilles isolés par la culture, ou lorsqu'on désire différencier le b. diphtéritique du b. pseudo-diphtéritique.

Il faut alors s'assurer que les colonies qu'on va inoculer sont bien pures. Pour cela, on choisit une de celles qui ne semblent contenir aucun organisme étranger ; on la dilue dans un tube de bouillon et on pratique, avec cette dilution, une séparation sur deux tubes de sérum. Ces tubes, ainsi que le bouillon, sont mis à l'étuve. Le lendemain, si la culture en

bouillon est pure, on l'inocule ; sinon, on ensemence un tube de bouillon avec l'une des colonies purifiées sur sérum (Roux et Yersin).

L'inoculation sous la peau du cobaye doit amener rapidement la mort, pour peu que le bacille diphtéritique possède quelque activité. Le bacille pseudo-diphtéritique ne tue jamais le cobaye, même à fortes doses. Le diagnostic des deux bacilles est rendu du reste presque inutile en pratique par cette constatation (de MM. Roux et Yersin), que, dans une angine diphtéritique, les colonies du b. de Löffler sont *toujours abondantes,* tandis que dans une angine non diphtérique, le bacille d'Hoffmann n'existe qu'à l'état de rares colonies.

Résultats fournis par l'examen bactériologique. — L'examen bactériologique est indispensable au *diagnostic.* En effet, il existe de nombreuses lésions pseudo-membraneuses non dipthériques ; et, d'autre part, dans la diphtérie, les fausses membranes peuvent faire défaut, soit qu'elles manquent encore, soit qu'elles aient déjà disparu des régions accessibles à l'examen clinique. L'étude bactériologique est par cela même indispensable au *traitement.* Toutefois, on n'attendra point le résultat de l'analyse pour faire une première injection de sérum.

L'examen bactériologique constitue la base de la *prophylaxie.* Tout cas suspect entrant à l'hôpital doit être immédiatement étudié ; s'il s'agit de diphtérie, on isolera le malade. Pareillement, aucun convalescent ne sera rendu à la vie commune s'il existe encore, dans la gorge ou dans les fosses nasales, des bacilles de Löffler.

L'examen bactériologiqué a-t-il une *valeur pronostique?* Des bacilles longs et abondants sont généralement l'indice d'une diphtérie grave. Des bacilles courts et peu abondants, avec de nombreuses formes

d'involution dans les fausses membranes, plaident en faveur de la bénignité. Mais ces différences ne sont pas rigoureuses. Il faut tenir compte d'autres éléments de pronostic et en particulier des *infections associées*.

B. Diagnostic sur le cadavre.

On aura rarement à rechercher le bacille diphtérique dans les *premières voies*, mais il peut être intéressant de prélever les fausses membranes et les tissus sous-jacents pour l'étude scientifique. Nous conseillons, comme fournissant des préparations fort élégantes, les coupes transversales de la luette et nous rappellerons que les bacilles de Löffler forment des amas appliqués directement sur l'exsudat fibrineux, tandis que les microbes « étrangers » siègent plus superficiellement, dans le mucus buccal.

On fera toujours, au contraire, l'examen du larynx et de la trachée dans les *croups sans angine* et l'examen de l'arbre bronchique dans la *bronchite pseudo-membraneuse*. L'organisme dipthérique sera alors isolé sans aucune difficulté.

Certains auteurs ont retrouvé le bacille de Löffler dans le *sang* et les *organes* (M. Nowak 9 fois sur 22 dans le sang. — MM. Kanthack et Stephens 10 fois sur 19 dans la rate et 19 fois sur 19 dans le poumon. — MM. Barbier et Tollemer assez souvent dans le sang, la rate et les centres bulbo-protubérantiels). Mais, dans tous ces cas, il paraît y avoir eu association microbienne. M. Métin, en inoculant le bacille diphtérique avec le streptocoque ou le staphylocoque, a déterminé une pareille généralisation chez le cobaye et le lapin.

V. *Sérothérapie de la diphtérie.*

Elle est tellement classique aujourd'hui que nous

nous bornerons à rappeler, dans ses points essentiels et d'après M. Roux, l'emploi du sérum antidiphtérique à titre préventif et curatif.

Préventivement. — Le sérum sera injecté à la dose de 5 centimètres cubes, aux personnes particulièrement exposées à la contagion. Ces personnes auront ainsi acquis l'immunité vis-à-vis de la diphtérie, mais pour 2-3 semaines seulement.

Curativement. — 5 à 10 centimètres cubes suffisent pour les diphtéries bénignes, prises au début ; 15 à 20 centimètres cubes sont nécessaires si la maladie est sévère, ou si elle date de plusieurs jours ; exceptionnellement il faudra aller jusqu'à 30 centimètres cubes et plus dans les cas très graves (notamment dans ceux où l'on est obligé de pratiquer la trachéotomie). En général, les fausses membranes se détachent dans les 24 heures qui suivent l'injection du sérum, si la dose de celui-ci est suffisante. Lorsqu'un enfant présente du tirage, on pourra souvent éviter la trachéotomie en injectant 15-20 centimètres cubes de sérum, et 10-20 centimètres cubes douze heures après, si l'amélioration n'est pas suffisante.

Il est bon d'injecter dès le début une bonne dose, plutôt que de répéter des injections de doses faibles.

Chez les enfants au-dessous d'un an, on injectera en général autant de centimètres cubes que l'enfant compte de mois.

AFFECTIONS DUES AU PNEUMOCOQUE

I. *Habitat et rôle pathogène du pneumocoque.*

Le pneumocoque se rencontre fréquemment dans l'organisme humain normal. Les affections qu'il peut produire sont des plus variables. Le tableau suivant donnera une idée de l'habitat et du rôle pathogène du microbe de Talamon-Fränkel.

Habitat. — Le peumocoque a été trouvé dans la bouche, les fosses nasales, les sinus, les bronches d'individus sains.

Affections dues au pneumocoque. — *App. circulatoire.* — Péricardites (séreuses et purulentes). Endocardites (le plus souvent aortiques). Artérites. Phlébites. — Le pneumocoque peut se trouver dans le sang (septicémie) lors de pneumonie ou de toute autre infection à pneumocoque.

App. respiratoire. — Broncho-pneumonies (primitives ou secondaires ; le pneumocoque est l'agent le plus habituel des broncho-pneumonies de l'adulte). Pneumonie lobaire (même suppurée ; le pneumocoque paraît bien en être l'agent exclusif chez l'homme). Pleurésies (sérofibrineuses et purulentes ; la pleurésie purulente à pneumocoque est la plus fréquente des pleurésies purulentes de l'enfant). Thyroïdites.

App. digestif. — Angines. Parotidites. Péritonites. Angiocholites (suppurées).

App. génito-urinaire. — Néphrites. Salpingites (purulentes).

Syst. nerveux et org. des sens. — Méningites (l'exsudat est cérébro-spinal dans un tiers des cas). Myélites.

(le pneumocoque a été trouvé dans la moelle même). Conjonctivites. Kératites purulentes (le pneumocoque en est l'agent principal). Otites moyennes (primitives et secondaires).

Syst. locomoteur. — Arthrites. Ostéites.

INFECTIONS SECONDAIRES DUES AUX PNEUMOCOQUE. — Elles se manifestent au cours de la grippe, de la diphtérie, etc.

II. *Principaux caractères du pneumocoque.*

Caractères morphologiques.

Dans les crachats, le pneumocoque affecte le plus souvent l'aspect diplococcique ; il se présente sous la forme de deux éléments arrondis, ovoïdes ou lancéolés, entourés d'une capsule commune ; cette capsule apparaît à l'état frais comme un halo clair. Même aspect dans le sang des animaux inoculés. Dans le pus et les cultures en milieux liquides, on trouve, à côté des diplocoques, de nombreuses chaînettes, parfois assez longues. Ces chaînettes peuvent offrir des capsules, dans le pus et les cultures en sérum liquide, mais il ne faut pas trop compter sur leur présence : elles manquent souvent, ou se réduisent à des dimensions qui les rendent peu caractéristiques. Le pneumocoque est immobile et ne forme pas de spores. Il se colore bien par les couleurs basiques d'aniline (on teintera la capsule à l'aide des procédés indiqués ailleurs) et prend le Gram.

Caractères de culture.

Dans le bouillon, il pousse assez bien, en produisant un léger trouble. Sur gélose, les colonies sont très caractéristiques. Elles apparaissent, au bout de

24 heures, sous forme d'îlots arrondis, transparents, à peine saillants, qu'on a comparés à des gouttes de rosée. Le pneumocoque ne se développe bien qu'à une température supérieure à 30°. Il ne donne pas de colonies visibles sur pomme de terre. Il offre une prédilection très connue pour les milieux nutritifs à base de sang ou de sérum ; c'est ainsi que les cultures sont infiniment plus riches en bouillon ascite qu'en bouillon ordinaire ; elles sont également plus abondantes sur gélose-ascite que sur gélose ordinaire, mais ici la différence est moins appréciable. Sur sérum coagulé, le pneumocoque donne des cultures un peu plus riches que sur gélose classique, mais les caractères sont les mêmes. En sérum liquide, les capsules deviennent souvent très nettes, surtout si l'on se sert de sérum de lapin jeune (Besançon et Griffon). Le mélange, à parties égales, de liquide d'ascite et de sang (défibriné de lapin, ou peptoné de chien) constitue un excellent milieu, dans lequel le pneumocoque conserve longtemps sa vitalité et sa virulence à 37° (B. et G.).

Caractères biologiques.

Le microbe de Talamon-Fränkel est à la fois aérobie et anaérobie. Il croît de 30° à 43°, mais son optimum thermique est de 37°. Il acidifie le bouillon et donne, en particulier, de l'acide formique. Il ne pousse pas dans sa propre culture, filtrée après 1 jour de développement, ainsi que l'un de nous l'a constaté.

Caractères d'inoculation.

L'animal réactif par excellence est la souris. De très petites quantités de virus suffisent pour provoquer, par inoculation sous-cutanée, une septicémie

aiguë, qui tue l'animal en 24 ou 48 heures. A l'autopsie, on trouve une hypertrophie considérable de la rate. L'examen microscopique de la pulpe des viscères ou du sang du cœur décèle la présence du pneumocoque à l'état d'extrême abondance. C'est donc avec le sang du cœur qu'on fera de préférence l'ensemencement des milieux de culture.

Le lapin est très sensible à l'injection intraveineuse. La mort survient en 24 à 48 heures et on rencontre de nombreux pneumocoques dans le sang et les organes. La rate est hypertrophiée et dure. On peut tuer le lapin par inoculations intrapulmonaire (avec hépatisation), intrapleurale ou intrapéritonéale (avec exsudats séreux et fausses membranes); et, aussi, par inoculation sous-cutanée, pourvu que le virus possède tant soit peu d'activité.

Le cobaye est plus résistant; on peut néanmoins le faire périr assez aisément par injection dans les séreuses.

Notons encore que chez le chien, le mouton et le rat, l'inoculation intrapulmonaire détermine des pneumonies typiques.

Les oiseaux sont complètement réfractaires.

III. *Diagnostic bactériologique des affections à pneumocoque.*

Le tableau, que nous avons donné plus haut, montre bien que les conditions dans lesquelles on sera amené à faire ce diagnostic sont loin d'être identiques et que la même méthode ne saurait convenir à tous les cas. C'est surtout dans les crachats qu'on aura à déceler la présence du microbe de Talamon-Fränkel. Chez les enfants, qui ne crachent pas, l'examen pourra porter sur le mucus pharyngé. Plus rarement c'est avec le pus, exceptionnellement avec le

sang ou le suc pulmonaire, que les recherches seront effectuées. L'*étude microscopique,* toujours très utile, devra être complétée par la culture et l'inoculation. On soumettra à l'examen deux préparations au moins, l'une colorée par la méthode de Gram, l'autre par l'un des procédés en usage pour teinter les capsules. Dans bien des cas, ces préparations donneront des aspects tout à fait caractéristiques.

Le meilleur milieu de *culture,* pour isoler le pneumocoque, est la gélose additionnée d'un tiers de liquide d'ascite. Les cultures, une fois développées, seront vérifiées et injectées à la souris ou au lapin.

L'*inoculation* représente de beaucoup le procédé de diagnostic le plus sûr. Il doit donc toujours passer avant les autres. Il est seul de mise lorsqu'il s'agit de produits peu abondants ou peu riches en microbes (par exemple le sang ou le suc pulmonaire). La souris sera préférée au lapin ; on l'infectera par la voie sous-cutanée. Le lapin sera inoculé de préférence dans les veines. On recherchera les capsules dans le sang et les organes des animaux inoculés.

La *réaction agglutinante* est applicable au diagnostic de la pneumonie et des affections à pneumocoque, ainsi que l'ont montré MM. Bezançon et Griffon. Le sérodiagnostic macroscopique n'est ici d'aucun secours et c'est exclusivement sur le sérodiagnostic microscopique qu'on devra s'appuyer. D'autre part, nous rappellerons que le pneumocoque ne s'agglomère qu'à l'état naissant. On prélèvera chez le malade un à deux centimètres cubes de sang. Une asepsie rigoureuse n'est pas indispensable, car les saprophytes de la peau se développent lentement dans le sérum. Celui-ci, une fois ensemencé avec le pneumocoque, sera mis à l'étuve à 37° et examiné au bout de 15 à 16 heures. Il est bon d'être prévenu que le pneumocoque, cultivé dans un mélange de sang et de

liquide d'ascite, y forme souvent des chaînettes, et qu'il conserve ce pouvoir lorsqu'il vient à être reporté dans les autres milieux nutritifs. On évitera cette cause d'erreur en le faisant passer préalablement par le sérum de lapin jeune, où il perd cette propriété.

Pour quelques auteurs (Kohn, Beco) on pourrait tirer, de la présence du pneumocoque dans le sang, une donnée importante pour le *pronostic* de la pneumonie. Le sang est puisé aseptiquement dans une veine du pli du coude et ensemencé en bouillon, ou inoculé à la souris. 23 cas de pneumonie, au cours desquels le pneumocoque n'existait pas dans la circulation générale, ont donné à M. Kohn 18 guérisons et 5 morts; tandis que 9 cas, où il était présent, ont fourni 7 morts et 2 guérisons. Dans ces deux derniers cas, de nombreux accidents métastatiques se sont produits.

Quelquefois c'est *sur le cadavre* que se posera le diagnostic. S'il s'agit de pneumonie, on cautérisera la surface du bloc hépatisé ; on y pénétrera avec une pipette Pasteur et le suc pulmonaire prélevé servira à préparer des lames et à faire les ensemencements et inoculations. Le pus, les exsudats, etc., seront recueillis aseptiquement et soumis aux mêmes opérations.

En terminant, nous dirons un mot du *diagnostic différentiel* entre le pneumocoque et deux microbes avec lesquels les débutants pourraient être exposés à le confondre : le streptocoque et le pneumobacille de Friedländer. Dans le pus, les chaînettes du pneumocoque peuvent simuler celles du streptocoque ; les caractères de culture et d'inoculation empêcheront toute confusion. Le pneumocoque offre avec le pneumobacille quelques caractères communs : existence d'une capsule; action pathogène pour la souris, etc...

Mais les caractères différenciels sont encore plus nombreux : le pneumo-bacille ne prend pas le Gram ; il pousse bien en gélatine et forme sur pomme de terre une culture épaisse et crémeuse; de plus, il est, en général, peu pathogène pour le lapin.

AFFECTIONS DUES AUX BACILLES ENCAPSULÉS

I. *Habitat et rôle pathogène des bacilles encapsulés.*

Les bacilles encapsulés, dont le pneumo-bacille de Friedländer représente le type, sont excessivement répandus et possèdent souvent des propriétés pathogènes. Le tableau suivant le démontrera.

Habitat. — Les b. encapsulés ont été trouvés dans la bouche, les fosses nasales (1 pour 100 des individus examinés — Abel), les sinus, la trachée et les bronches, les selles et l'intestin des gens sains. On les rencontre dans les eaux, l'air, le sol, etc...

Affections dues aux b. encapsulés. — *App. circulatoire.* — Péricardites (séreuses et purulentes). Endocardites. Les affections à b. encapsulés affectent assez volontiers la forme septicémique.

App. respiratoire. — Bronchopneumonies. Abcès du poumon. Pleurésies (séreuses et suppurées).

App. digestif. — Angines (subaiguës et chroniques). Parotidites. Ictère bénin (ponction du foie — Banti). Abcès du foie.

Syst. nerveux et org. des sens. — Méningites. Conjonctivites (chez les ozéneux). Kératites. Otites moyennes. Rhinites. Ozène. Rhinosclérome. Empyème du sinus maxillaire.

App. génito-urinaire. — Abcès du rein. Cystites.

App. tégumentaire. — Abcès.

Nous prendrons le *pneumobacille* comme type de description ; nous indiquerons ensuite les particularités propres aux *bacilles de l'ozène et du rhinosclérome*; puis, nous indiquerons, d'après M. Strong, comment on peut classer, au moins provisoirement, les bacilles encapsulés.

II. Pneumobacille de Friedländer.

Il est très répandu dans la nature ; on le rencontre communément dans les eaux et les poussières. Il a été trouvé par MM. Ch. Nicolle et Hébert dans les vases de la Seine. Son rôle pathogène est également très varié ; une grande partie des affections, mentionnées dans le tableau précédent, paraît due à des pneumobacilles types.

Caractères morphologiques.

Le pneumobacille se présente dans l'organisme sous forme d'un bâtonnet long de 1 à 2 μ. Les individus, fréquemment réunis deux par deux, sont entourés d'une capsule. Cette capsule s'observe aussi dans les cultures en milieux-sang et en milieux-sérum. Elle est à peine indiquée dans la gélatine et sur gélose. Elle fait constamment défaut dans le bouillon, où le bacille présente un *polymorphisme* très accentué. Le microbe de Friedländer est toujours immobile et ne donne jamais de spores. Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et se décolore par la méthode de Gram. La coloration de la capsule est obtenue par les procédés spéciaux, décrits dans la première partie de cet ouvrage.

Caractères de culture.

Le bacille de Friedländer se développe rapidement en bouillon, où il produit un trouble très marqué ; une collerette visqueuse se montre à la surface, au bout de 12 à 24 heures, puis le liquide lui-même devient visqueux. L'ensemencement dans la gélatine donne lieu à un aspect assez spécial ; une traînée blanche apparaît le long de la piqûre et se termine, au niveau de la surface libre, par un disque saillant ; l'ensemble rappelle exactement la forme d'un clou. La gélatine n'est pas liquéfiée. En plaques, les colonies sont blanches, sans caractères spéciaux. Sur gélose, la culture est abondante et visqueuse. Le développement reste moins riche sur sérum coagulé. Il est peu marqué dans le sérum liquide, mais le pneumobacille y forme de belles capsules. Sur pomme de terre, on observe une épaisse couche crémeuse, souvent soulevée, çà et là, par des bulles de gaz.

Caractères biologiques.

Le bacille de Friedländer est un anaérobie facultatif ; il ne forme pas d'indol et coagule le lait de façon inconstante. Il fait fermenter tous les sucres, excepté l'érythrite. Cette fonction fermentative varie un peu, il est vrai, suivant les échantillons. Un bacille mentionné par M. Frankland ne faisait fermenter ni la dulcite, ni la glycérine. Deux autres, isolés par M. Grimbert et cinq, isolés par M. Hébert, faisaient fermenter la glycérine et non la dulcite. Les produits de la fermentation ont été étudiés par M. Grimbert, sur 4 échantillons, à l'aide d'un milieu composé de 100 parties d'eau, de 3 parties de sucre, de 2 parties

de peptone et d'un peu de carbonate de chaux. Ces produits sont les suivants :

En présence de :

Glucose, galactose, arabinose, mannite	: alcool + ac. acétique + ac. lactique gauche.
Glycérine. . . .	: alcool + { ac. acétique (3 fois) / ac. formique (1 fois) } + ac. lactique gauche.
Dulcite.	: alcool + ac acétique + ac. succinique.
Lactose.	: alcool + ac. acétique + { ac. succinique + ac. lact. gauche (1 fois). / ac. succinique (3 fois). }
Saccharose, maltose	: alcool + ac. acétique + ac. lact. gauche + ac. succinique.
Dextrine.	: alcool (?) + ac. acétique + ac. succinique.
Pomme de terre.	: alcool (?) + ac. acétique + ac. succinique.

Caractères d'inoculation.

Les *résultats* observés sont *très différents* suivant les échantillons. Il existe des pneumobacilles complètement avirulents, d'autres très virulents. On peut rencontrer, entre ces deux extrêmes, tous les intermédiaires.

L'animal de choix est la souris. Une petite quantité de culture en bouillon (un demi-centimètre cube environ), inoculée sous la peau, la fait mourir en vingt-quatre heures, avec un abcès local à pus visqueux et de l'hypertrophie de la rate. On retrouve le microbe dans le sang et les organes. Les résultats obtenus chez le cobaye sont plus inconstants. L'injection sous-cutanée n'est souvent suivie que d'un abcès à pus visqueux ; quelquefois la mort se produit au bout d'une dizaine de jours et on trouve à l'autopsie des lésions broncho-pulmonaires. L'inoculation intrapéritonéale tue plus rapidement et de façon plus constante. L'injection de 2 centimètres cubes de culture dans les veines du lapin détermine le plus souvent une mort rapide. Inoculé dans la plèvre du chien, le bacille de Friedländer le tue 1 fois sur 5. L'ingestion provoque assez souvent de la diarrhée, mais n'est jamais suivie de mort. Un certain nombre

d'échantillons, inoculés dans le péritoine du pigeon, le tuent rapidement.

On observe, au point de la virulence, de notables *variations qualitatives*. Certains pneumobacilles, qui tuent la souris sous la peau, ne se montrent que peu ou pas pathogènes, lorsqu'ils sont inoculés dans le péritoine du cobaye et du pigeon. D'autres, inoffensifs pour la souris sous la peau, amènent la mort du cobaye et du pigeon quand on les injecte dans le péritoine. Notons qu'à la suite de l'inoculation intrapéritonéale, le microbe se rencontre assez souvent, après la mort, dans le contenu intestinal. Ajoutons enfin qu'Hébert, après avoir excorié la vulve de la lapine, le plancher de la bouche et le pharynx chez le pigeon, a réussi à reproduire des fausses membranes.

Diagnostic bactériologique des affections à pneumobacilles.

Il comprend deux points : l'*isolement* du microorganisme et sa *différenciation*. L'examen microscopique du pus, des crachats, ou des fausses membranes, fournit déjà des données importantes, en montrant un bacille polymorphe et encapsulé, qui se décolore par la méthode de Gram. Le milieu de culture électif, surtout pour l'ensemencement des fausses membranes, est le sérum coagulé. Les colonies grisâtres et visqueuses du pneumobacille, se distinguent aisément de celles du bacille de Löffler. Enfin, l'inoculation à la souris fournira, comme pour le pneumocoque, le meilleur moyen de déceler la présence du microbe de Friedländer dans les crachats. Une fois isolé, le pneumobacille sera facilement distingué du pneumocoque (*ubi supra*). L'immobilité du b. de Friedländer, la présence de capsules dans les humeurs

et les milieux de culture albumineux, l'absence de production d'indol, etc., permettront de ne pas le confondre avec le colibacille.

III. *Bacille de l'ozène.*

MM. Löwenberg, Marsano et Abel en font un microbe spécial. Sur 100 cas d'ozène, M. Abel a rencontré 100 fois le micro-organisme auquel il a donné le nom de *bacillus mucosus ozenæ*; tandis que chez 100 personnes saines, il ne trouvait qu'une fois le b. de Friedländer. M. Abel n'indique pas cependant de caractères différentiels *rigoureux* entre le b. ozenæ et le pneumobacille. La fétidité caractéristique serait due, d'après lui, à des infections secondaires. Enfin, il aurait reproduit une fois, chez un individu sain, les premiers stades de l'affection, par inoculation intranasale de ses cultures.

IV. *Bacille du rhinosclérome.*

Le rhinosclérome est caractérisé, comme on le sait, par une infiltration chondroïde siégeant au niveau de la cloison nasale, des narines, de la pituitaire, de la peau de la lèvre et de la muqueuse pharyngo-laryngienne. Si on coupe les tumeurs scléromateuses, il s'en écoule un liquide laiteux, tout à fait comparable au suc cancéreux. L'examen microscopique de ce liquide, ainsi que du produit de raclage du néoplasme, ne montre d'ordinaire aucun micro-organisme, mais les ensemencements révèlent la présence d'un bacille encapsulé, très analogue à celui de Friedländer. Tout au plus peut-on remarquer que la capsule du b. du rhinosclérome (ou *b. de Frisch*) est d'ordinaire plus développée que celle du pneumobacille et qu'elle a moins de tendance à disparaître dans les cultures.

Le b. de Frisch ne coagule pas le lait et ne fait pas fermenter les sucres ; ses cultures sont souvent moins abondantes que celles du b. de Friedländer. Il est d'ordinaire assez peu pathogène pour les animaux. Toutefois, l'injection intrapéritonéale de 2 centimètres cubes de culture en bouillon tue fréquemment le cobaye. On trouve, à l'autopsie, des lésions de péritonite, avec exsudats purulents épais sur le foie, la rate, les anses intestinales. Le microbe peut être isolé du sang et des organes. Toutes les tentatives faites pour reproduire, chez les animaux, une tumeur analogue au rhinosclérome ont régulièrement échoué.

Sur les *coupes* des parties malades, on découvre, au milieu d'un feutrage conjonctif, de grandes cellules sphériques, atteignant un diamètre de 20 à 30 μ. Ce sont les *cellules de Mikulicz,* ainsi nommées du nom de l'auteur qui les a le premier décrites. Ces grandes cellules ont un protoplasma réticulé ; elles présentent un ou plusieurs noyaux et sont tout à fait caractéristiques de l'affection. Elles contiennent les bacilles de Frisch, ordinairement renfermés dans des vacuoles. Ces bacilles intracellulaires sont parfois très abondants (10-30 et davantage) ; ils possèdent une capsule, analogue à celle qu'on rencontre dans les cultures artificielles. Il existe aussi des bacilles extracellulaires, situés dans les fentes et les vaisseaux lymphatiques. Certains auteurs recommandent la fixation à l'acide osmique, comme le meilleur moyen de rechercher le bacille du rhinosclérisme au sein des tissus ; l'un de nous a pu se rendre compte des avantages sérieux de cette méthode.

V. *Classification des bacilles encapsulés.*

M. Strong en fait deux groupes : 1° le *groupe Friedländer,* comprenant le pneumobacille, le bacille de

l'ozène et quelques autres ; peut-être aussi, dit-il, le bacille de Frisch ; 2° le *groupe aerogenes,* auquel répondent divers échantillons trouvés dans le monde extérieur et les produits pathologiques. M. Grimbert est encore plus radical, puisqu'il *identifie* le pneumobacille au b. aerogenes.

Quoi qu'il en soit, voici les caractéristiques essentielles des deux groupes de Strong. (1° Groupe Friedländer — Sur gélose : colonies jeunes, transparentes ; colonies anciennes, blanc opaque — Capsules constantes et facilement colorables. — Production de gaz, intense en présence du saccharose, moins marquée en présence du glucose, faible ou nulle en présence du lactose. — Pas de coagulation du lait — 2° Groupe aerogenes. — Capsules inconstantes et difficiles à colorer. — Sur gélose : colonies blanches d'emblée. — Production de gaz constante et très intense en présence des trois sucres mentionnés. — Coagulation du lait.

AFFECTIONS DUES AUX STAPHYLOCOQUES

Les staphylocoques sont les *microbes pyogènes par excellence.* On en distinguait jadis deux groupes, les uns liquéfiant, les autres ne liquéfiant pas la gélatine. Cette distinction n'a plus aujourd'hui de raison d'être. On peut rencontrer, par exemple dans le pus (comme cela est arrivé à l'un de nous), des staphylocoques dorés dont tous les individus ne liquéfient pas. D'autre part, on voit certains échantillons perdre peu à peu la faculté de digérer la gélatine, à mesure qu'on les repique ; après quelques années la transformation est accomplie. Nous rappellerons qu'il existe trois variétés principales des staphylocoques : staph. aureus, staph. citreus et staph. albus, variétés qui ne diffèrent que par la teinte des cultures.

I. *Habitat et rôle pathogène des staphylocoques.*

L'habitat de ces organismes est très varié ; les affections qu'ils déterminent sont aussi fort nombreuses. Le tableau suivant en donnera une idée.

Habitat. — Les staphylocoques ont été trouvés dans la bouche, le tube digestif, les fosses nasales, les sinus, le canal de l'urètre (femme) et sur la peau d'individus sains. Ils sont abondants dans l'eau, l'air, le sol.

Affections dues aux staphylocoque. — *App. circulatoire.*—Péricardites (suppurées). Endocardites. Myocardites (suppurées). Phlébites. — Les staph.

peuvent se trouver dans le sang (septicémie); ils peuvent aller engendrer partout des métastases (pyohémie).

App. respiratoire. — Laryngites. Broncho-pneumonies. Pleurésies (séreuses et purulentes). Thyroïdites.

App. digestif. — Angines. Parotidites. Péritonites. Angiocholites (suppurées). Abcès du foie. Ictères graves (hyperthermiques).

App. génito-urinaire. — Néphrites. Infection urinaire (formes pyémiques). Cystites. Métrites. Infection puerpérale (certains cas).

Système nerveux et organes des sens. — Méningites. Encéphalites (suppurées). Kératites. Otites moyennes (primitives et secondaires). Empyème du sinus maxillaire.

Système locomoteur. — Arthrites. Ostéomyélites (les staph. en sont les agents les plus habituels).

Tégument externe. — Furoncle et anthrax (les staph. en sont les agents constants). Folliculites suppurées. Impetigo et ecthyma. Abcès et phlegmons (abcès du sein).

INFECTIONS SECONDAIRES DUES AUX STAPHYLOCOQUES. — Elles se manifestent au cours de la fièvre typhoïde, de la diphtérie, de la grippe, etc.

II. *Staphylocoque doré.*

Nous le prendrons *comme type* dans la description qui va suivre.

Caractères morphologiques.

Les staphylocoques dorés se présentent sous la forme d'amas de grains réguliers, qui ont été comparés aux

grains d'une grappe de raisin ; assez souvent aussi, ils offrent l'aspect de diplocoques. Dans le pus, on les rencontre tantôt libres, tantôt inclus au sein des leucocytes, où ils peuvent constituer de petits groupes. Ils ne produisent pas de spores. Ils sont immobiles. Enfin, ils se colorent facilement par toutes les couleurs basiques d'aniline et par la méthode de Gram.

Caractères de culture.

Le staphylocoque doré se développe dans le bouillon en 24 heures ; le milieu est fortement troublé et le trouble persiste, bien qu'il se forme au fond du tube un dépôt abondant. A la surface, se voit un anneau orangé. La culture dégage une odeur désagréable. Sur gélose, apparaît très rapidement une couche épaisse, luisante, d'un ton jaune orange. Dans la gélatine, par piqûre, on observe une liquéfaction en entonnoir, de forme variée ; la culture continue abondamment, dans le liquide produit, lequel offre une teinte orangée à sa partie superficielle. Sur plaques, ce sont de petites colonies jaunes avec, tout autour, un godet de liquéfaction (on n'oubliera point que le staph. doré peut offrir le type non liquéfiant). La culture sur pomme de terre présente la teinte orangée caractéristique. Enfin le lait, ensemencé, se coagule.

Caractères biologiques.

Le staphylocoque doré peut vivre à l'abri de l'air, mais il ne forme pas de pigment dans le vide. Il pousse dans des limites de température assez étendues (de 15° à 44°) ; la température optima pour la formation du pigment est de 22°. Bien que ne donnant pas de spores, il est très résistant vis-à-vis de di-

verses autres causes de destruction. Il conserve aussi sa vitalité dans les cultures pendant un temps fort long.

Caractères d'inoculation.

Le lapin et le cobaye sont assez sensibles. L'inoculation sous-cutanée détermine chez eux un abcès local, le plus souvent sans gravité. L'inoculation intrapéritonéale provoque une péritonite suppurée et entraîne, dans un temps variable, la mort de l'animal. L'inoculation intraveineuse amène parfois, chez le lapin, une mort rapide sans lésions macroscopiques ; on retrouve alors les staphylocoques dans le sang et les organes (surtout dans le rein). Mais, le plus souvent, la mort ne survient qu'après une ou plusieurs semaines ; l'animal maigrit et présente de la fièvre ; à l'autopsie, on rencontre des abcès viscéraux, comme dans l'infection purulente de l'homme. Les abcès s'observent en particulier dans les reins ; ces organes sont augmentés de volume et leur surface présente des saillies blanchâtres, constituées par de petits nodules purulents. La dégénérescence amyloïde a été signalée par M. Kravkoff, chez les lapins qui succombent après un très long temps.

En produisant préalablement des lésions de l'endocarde, on peut obtenir des endocardites, chez le lapin, à la suite d'injections intraveineuses. On obtient le même résultat en injectant simplement des cultures sur pomme de terre ; mais il faut avoir soin d'injecter simultanément des fragments ténus du milieu de culture. En lésant préalablement une articulation, on détermine parfois une arthrite suppurée. Enfin, en traumatisant la diaphyse d'un os long, chez un animal jeune, on peut reproduire une ostéomyélite (le traumatisme n'est même pas indispensable).

Le rat et le chien sont moins réceptifs que le cobaye et surtout que le lapin. L'inoculation sous-cutanée produit chez eux un abcès ou une escarre sans gravité. L'inoculation péritonéale est suivie, dans certains cas, d'une septicémie mortelle. La souris est plus sensible que les deux animaux précédents ; elle succombe assez souvent à l'inoculation sous-cutanée.

Faisons remarquer en terminant que, le plus ordinairement, les staphylocoques sont doués d'une *virulence médiocre* et même restent tout à fait avirulents ; il est rare de rencontrer des échantillons vraiment très actifs et cette activité reste toujours bien inférieure à celle des agents septicémiques types (pneumocoque, streptocoque, pasteurellæ, etc.).

III. *Staphylocoques blanc et citrin.*

Ces staphylocoques possèdent, à la teinte près, tous les attributs du staphylocoque doré ; ils ne sont pas plus souvent avirulents, quoi qu'on en ait dit. Le staph. albus forme, sur gélose et sur pomme de terre, un dépôt porcelainé ; le staph. citreus (bien plus rare que les deux autres), un enduit jaune serin. Tous deux peuvent ne pas liquéfier la gélatine.

IV. *Diagnostic bactériologique des affections à staphylocoques.*

Les staphylocoques sont si répandus dans la nature, ils sont si abondants sur les téguments et dans les cavités naturelles, qu'une *grande circonspection* devient nécessaire quand il s'agit de leur attribuer un rôle pathogène. Aujourd'hui, l'annonce de la découverte de staphylocoques dans une lésion donnée se heurte (et souvent à juste titre) à l'indifférence et même à l'incrédulité générales. L'attention doit être

attirée, en particulier, sur la constance des staphylocoques à la surface de la peau. Ainsi que nous l'avons vu, il est indispensable, pour se mettre à l'abri de cette cause d'erreur, de pratiquer toutes les ponctions à travers l'escarre produite par le fer rouge. L'examen histologique offrira par conséquent une grande importance dans le diagnostic des affections à staphylocoques et ne devra jamais être négligé. Si la présence des cocci dans les lésions est incontestable, on en pourra tirer un fort argument en faveur de leur rôle pathogène. Les staphylocoques s'isoleront aisément sur plaques de gélatine ; on les inoculera de préférence au lapin.

AFFECTIONS HUMAINES DUES AUX STREPTOCOQUES

I. *Habitat et rôle pathogène des streptocoques.*

Les streptocoques sont fréquents dans le milieu extérieur ; ils produisent chez l'homme des maladies ou des lésions extrêmement variées. Nous avons résumé, dans le tableau suivant, ce qui concerne leur habitat et leur rôle pathogène.

Habitat. — Les streptocoques ont été retrouvés dans la bouche, le tube digestif, les fosses nasales, le canal de l'urètre (femme) d'individus sains. — Ils sont abondants dans l'eau, l'air, le sol.

Affections dues aux streptocoques. — *Appareil circulatoire.* — Péricardites (séreuses et purulentes). Endocardites (le plus souvent mitrales). Myocardites (suppurées). Artérites. Phlébites et thromboses cachectiques. Les streptocoques peuvent se trouver dans le sang (septicémie) en des circonstances très variées ; le pronostic n'est pas forcément fatal.

Appareil respiratoire. — Laryngites. Bronchites. Broncho-pneumonies (primitives ou secondaires). Pleurésies (séreuses et purulentes ; la pleurésie purulente à str. est la plus fréquente des pleurésies purulentes de l'adulte). Thyroïdites.

Appareil digestif. — Angines (les str. jouent le rôle prépondérant dans toutes les angines non diph-

tériques : catarrhales, pseudo-membraneuses et phlegmoneuses, soit primitives, soit secondaires). Parotidites. Entérites. Péritonites. Angiocholites (suppurées). Ictères graves (hyperthermiques).

Appareil génito-urinaire. — Néphrites. Infection urinaire (certains cas). Métrites. Salpingites (purulentes). Infection puerpérale. — L'urine renferme des str. dans diverses maladies (ils sont constants chez les scarlatineux, quand l'urine contient de l'albumine).

Système nerveux et organes des sens. — Méningites. Encéphalites (suppurées). Myélites. Conjonctivites (d'origine lacrymale, souvent compliqués d'iritis). Kératites. Dacryocystites. Otites moyennes (primitives et secondaires).

Système locomoteur. — Arthrites. Ostéites. Adénites.

Tégument externe. — Plaques purpuriques (chez les scarlatineux). Erysipèle (type ; à répétition ; cataménial). Abcès et phlegmons. Lymphangites (chez les variqueux, notamment). Piqûres anatomiques.

Infections secondaires dues aux streptocoques. — Elles se manifestent au cours de la scarlatine, de la diphtérie, de la fièvre typhoïde, de la rougeole, des oreillons, de la tuberculose, etc...

Nous prendrons comme type de description le *streptocoque classique,* qu'on nomme encore *str. pyogène,* pour le distinguer du str. gourmeux. Après avoir indiqué ses caractères et la manière de le rechercher dans les produits pathologiques, nous étudierons la sérothérapie des affections qu'il engendre. Enfin, nous terminerons ce chapitre par la mention de plusieurs streptocoques rencontrés chez l'homme et offrant, avec le type classique, des différences importantes.

II. *Principaux caractères du streptocoque classique.*

Caractères morphologiques.

Dans le pus, le streptocoque se présente sous forme de chaînettes, à grains plus ou moins réguliers (fig. 144), ou simplement de diplocoques. Les microbes sont libres ou intraleucocytaires. Dans le sang, on rencontre surtout des formes en diplocoques. Dans les cultures en bouillon, les chaînettes deviennent parfois très longues. On observe couramment des variations dans le volume des individus dont elles sont formées, mais ces variations n'ont pas l'importance qu'on a voulu leur attribuer. Le streptocoque ne forme pas de spores. Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram.



Fig. 144. — Streptocoque.

Caractères de culture.

Le streptocoque se développe abondamment et rapidement dans le bouillon ; tantôt il forme d'emblée un dépôt floconneux, rassemblé au fond du liquide resté clair ; tantôt, au contraire, le bouillon se trouble uniformément et ne redevient clair qu'après quelques jours, par suite du dépôt des germes. La distinction en *streptococcus longus* et en *streptococcus brevis*, qu'on a voulu établir d'après ces deux types de dé-

veloppement, ne repose sur aucun fondement sérieux. Le streptocoque se développe très bien en bouillon glycériné à 5 pour 100 ; M. Ucke considère même ce milieu comme le plus favorable à l'isolement du microbe. Sur gélose, apparaît un semis de colonies punctiformes, grisâtres, beaucoup moins transparentes que celles du pneumocoque. Exceptionnellement, on trouvera des colonies plus volumineuses et un peu festonnées. Par piqûre dans la gélatine, on observe une traînée blanche, formée de granulations séparées, dont le volume ne dépasse pas celui d'une tête d'épingle. Le milieu n'est pas liquéfié à 22° ; mais il faut savoir que certains échantillons digèrent la gélatine à 36° (Pane). Sur sérum, les colonies sont petites, sans grand caractère. On n'observe, la plupart du temps, aucun développement sur pomme de terre. Enfin, quelques échantillons coagulent le lait.

Caractères biologiques.

L'optimum thermique est de 37°. Le streptocoque se montre à la fois aérobie et anaérobie. Il acidifie le bouillon et perd alors rapidement sa virulence et sa vitalité. Si on fait des repiquages avant l'apparition de l'acidité, on obtient des races qui donnent de belles cultures, acidifient le bouillon moins rapidement, et se montrent plus résistantes. Si on fait des repiquages chaque jour, à partir du moment où l'acidité apparaît, on obtient des races de plus en plus chétives et de moins en moins résistantes ; elles acidifient d'autant plus vite que la culture-mère était elle-même plus acide (Achalme). Pour conserver la virulence et la vitalité du streptocoque, il convient de faire usage des milieux-sérum. Ceux-ci donnent d'ailleurs des cultures très abondantes, comme on peut

s'en assurer en ensemençant, par exemple, le microbe en bouillon-ascite. L'un de nous a pu vérifier que le streptocoque ne pousse plus dans sa culture filtrée, après six jours de développement.

Caractères d'inoculation.

Le résultat des inoculations se montre très variable, suivant la virulence des échantillons. On se servira toujours de cultures jeunes. L'animal de choix est le lapin. Sous la peau, on peut obtenir, selon l'activité du virus, soit la mort par septicémie (avec dyspnée, diarrhée et coma), soit une lésion locale (œdème, suppuration), avec ou sans généralisation, soit un résultat négatif. L'inoculation à l'oreille est spécialement intéressante. On reproduit souvent un *érysipèle type*. Au niveau du point d'inoculation, apparaît alors un œdème marqué, limité par un bourrelet saillant. L'œdème s'étend à toute l'oreille, qui devient pendante ; elle tombe sur le côté, immobile, et traîne presque à terre. On la trouve, à l'examen, tuméfiée, bleuâtre, chaude et sensible à la pression. L'animal maigrit et peut succomber ; dans certains cas il se rétablit, mais une partie plus ou moins grande de l'oreille s'escarrifie et est éliminée par un sillon de suppuration. Nous devons faire remarquer toutefois que cet érysipèle, pour si caractéristique qu'il paraisse de prime abord, n'est *nullement spécifique*. On a reproduit pareille lésion avec le b. coli, le staphylocoque, le pneumocoque, et avec un bacille trouvé par M. Koch. L'inoculation intraveineuse détermine rapidement la mort, si le streptocoque est très actif. On peut tuer cependant le lapin avec un virus de force moyenne, à condition d'injecter de fortes doses. L'inoculation intrapéritonéale (ou intrapleurale) fait périr les animaux par septicémie ;

on trouve, *loco læso,* un exsudat, généralement hémorragique.

Chez le cobaye, le streptocoque, introduit sous la peau, ne provoque d'accidents que s'il est très virulent ; mais, à la suite de l'inoculation intrapéritonéale, on observe fréquemment la mort par généralisation, avec exsudat séro-purulent. Chez la souris, les résultats se montrent fort variables. L'injection sous-cutanée peut déterminer une septicémie à évolution rapide ou un simple abcès local.

L'inoculation à l'homme a été tentée par MM. Fehleisen, Janicke et Neisser, Koch et Petruschky. L'érysipèle a pu être ainsi reproduit un certain nombre de fois. Souvent, on n'a rien obtenu, même avec des virus très actifs pour les animaux, mais, par contre, dans une expérience, le sujet a succombé en 4 jours.

III. *Diagnostic des affections dues au streptocoque.*

Dans l'*érysipèle,* l'agent pathogène se retrouve constamment. On le recherchera surtout au niveau du bourrelet saillant. Il fait défaut dans le liquide des phlyctènes, son siège demeurant intradermique. Pour établir le diagnostic, on pratique, sur la peau aseptisée, de légères scarifications superficielles, au niveau du bourrelet ; on presse légèrement la peau entre deux doigts, de manière à faire sourdre un peu de sérosité et l'on ensemence le liquide exsudé.

Dans le cas d'une *suppuration*, on commencera par faire des lames, afin de voir si le streptocoque est présent et s'il se trouve à l'état de pureté. On pratiquera ensuite, soit des ensemencements en bouillon, soit des isolements sur gélose et, aussi, le cas échéant, en gélatine. Le streptocoque se développe parfois

assez mal dans ce dernier milieu, lorsqu'il provient directement d'un foyer suppuré; c'est pour cela qu'il est prudent d'ensemencer, concurremment, des tubes de gélose.

Lors de *septicémie chirurgicale* ou *puerpérale*, on peut avoir à rechercher le streptocoque dans le sang. On ponctionnera, avec une seringue stérilisée, une des veines superficielles de l'avant-bras et on ensemencera le sang en aussi grande quantité que possible.

Dans le cas d'*angine*, les ensemencements seront faits en général sur sérum coagulé. On prélèvera les colonies avec le fil de platine et on les repiquera en bouillon. Le streptocoque existe, avons-nous dit, à l'état normal dans la bouche, les fosses nasales, le tube digestif. Aussi convient-il d'observer une certaine réserve, lorsqu'il s'agit d'apprécier le rôle pathogène d'un streptocoque provenant de ces régions. On accordera une plus grande importance au nombre des colonies isolées qu'à leur virulence, car un streptocoque actif pour l'homme peut se montrer tout à fait inoffensif pour le lapin (*ubi supra*) et inversement. L'inoculation sous la peau de l'oreille ne devra jamais cependant être négligée. Dans certains cas enfin, les résultats fournis par les ensemencements pourront être utilement contrôlés par la recherche du micro-organisme dans les coupes.

IV. *Sérothérapie des affections à streptocoques.*

Le sérum antistreptococcique (*sérum de Marmorek*) sera employé dans toutes les affections où le streptocoque joue le rôle d'agent d'infection primaire ou secondaire (érysipèle, suppurations, fièvre puerpérale, etc., — grippe, diphtérie, scarlatine, etc.). On l'injectera, le plus tôt possible, à la dose initiale de

20 centimètres cubes; si le cas est grave, il ne faut pas hésiter à donner jusqu'à 50 centimètres cubes et même davantage, dans les premières vingt-quatre heures. On continuera le traitement jusqu'à disparition complète des symptômes, en administrant quotidiennement 20 à 40 centimètres cubes, selon les circonstances. Dans les derniers jours, 10 centimètres cubes suffisent. Comme on le voit, le sérum antistreptococcique s'emploie toujours à des doses bien plus élevées que le sérum antidiphtérique.

V. *Streptocoques différant du str. pyogène.*

Nous nous contenterons de mentionner les quatre suivants (le streptocoque de Bonome sera décrit à propos de la méningite cérébro-spinale) :

Streptocoque de la salive (Veillon).

Fréquent dans la bouche. Il se distingue du str. classique par la plus grande irrégularité de ses grains, par la plus grande transparence des colonies sur gélose, par sa culture facile sur pomme de terre et par son avirulence. Il est sans doute identique au streptocoque décrit jadis par M. Marot.

Streptococcus tenuis (Veillon).

C'est un hôte normal de la cavité buccale. Les grains qui le constituent sont extrêmement ténus et un peu allongés. Sur gélose, les colonies se montrent sous la forme de points très fins. En bouillon, on n'observe qu'un trouble fort léger. Enfin, le microbe ne pousse pas dans la gélatine et ne possède aucun pouvoir pathogène.

A côté des *saprophytes* précédents, qui pourraient être incriminés à tort dans les affections bucco-pharyngées et qui doivent pour cela être bien connus, nous citerons *deux types pathogènes* manifestement distincts, aux aussi, du str. classique.

Streptocoque de Méry.

Chez six scarlatineux sur sept, M. Méry a rencontré un streptocoque, qu'il considère comme l'agent le plus fréquent des complications de la scarlatine. Cet organisme se compose de gros grains, disposés en longues chaînettes. Il est difficile à renforcer. Inoculé au lapin, même par la voie sous-cutanée, il offre une tendance caractéristique à se localiser sur les articulations. Le sérum de Marmorek ne l'influence nullement.

Streptocoque du bouton d'Alep.

L'un de nous, avec le D[r] Noury bey, a isolé de plusieurs cas de bouton d'Alep (actuellement une quinzaine) un streptocoque qui paraît bien être la cause de l'affection ; il peut d'ailleurs exister à l'état de pureté dans la sérosité purulente. Il pousse abondamment dans le bouillon et sur la gélose ; il ne se développe pas sur pomme de terre ; il coagule le lait constamment (en 30 heures environ). Peu virulent, il tue presque toujours le cobaye plus rapidement que le lapin (injection intrapleurale). Il est plus difficile à renforcer que le str. pyogène. Enfin, il n'est pas justiciable du sérum de Marmorek.

Cette propriété, de n'être pas justiciable du sérum de Marmorek, se rencontre chez un certain nombre de streptocoques qui, à part ce caractère, ne diffèrent nullement du type classique.

AFFECTIONS DUES AUX TÉTRAGÈNES

Les tétragènes forment une famille de micro-organismes encore mal classés et imparfaitement connus. M. Teissier les divise en deux groupes : le premier, constitué par le tetragenus septicus, le second par les tétragènes saprophytes (t. subflavus, variabilis, mobilis ventriculi, concentricus, aureus). Le tetragenus aureus peut cependant devenir pathogène dans certaines conditions.

Les tétragènes ont été trouvés à l'*état saprophytique* dans la salive, l'estomac, le mucus nasal, l'air, etc.; à l'*état pathogène* dans les crachats et les cavernes des tuberculeux, dans certaines angines, dans des abcès voisins du tube digestif (abcès dont le pus est souvent crémeux, visqueux et même huileux), dans le lait d'une nourrice atteinte d'adénite axillaire, dans quelques infections à forme septicémique (Chauffard et Ramon, Netter, Achard), etc...

Le tétragène type (*t. septicus*) appartient au groupe *merista*. Il est formé par la juxtaposition de quatre éléments, entourés (tout au moins dans le sang et les viscères) d'une capsule irrégulière. Cette capsule affecte souvent la forme d'un trèfle ou d'une pensée. Elle est moins nette et peut même manquer dans le pus ; on ne la rencontre jamais dans les cultures. Le tétragène se colore par la méthode de Gram. Il trouble le bouillon de façon uniforme ; le liquide devient bientôt filant et très alcalin. Il forme, à la surface de la gélose, un dépôt visqueux et grisâtre. Le développement est lent en gélatine ; celle-ci n'est pas liquéfiée,

ou l'est très faiblement (Chauffard et Ramon). Le tétragène produit, sur pomme de terre, un enduit épais et filant. Il ne coagule pas le lait. Il pousse mal dans les milieux glycérinés et ne donne que des cultures maigres à l'abri de l'air. L'optimum thermique est de 37°.

Les animaux de choix, pour l'inoculation, sont le cobaye et la souris. L'injection sous-cutanée provoque, suivant la virulence du microbe injecté, des abcès à évolution aiguë ou lente. Le pus de ces abcès présente fréquemment une viscosité analogue à celle qui s'observe chez l'homme. A la suite de l'infection intrapéritonéale ou intrapleurale, la mort survient plus rapidement ; le péritoine ou les plèvres contiennent souvent le pus visqueux caractéristique ; la rate est hypertrophiée ; l'agent pathogène s'isole du sang et des organes. Le lapin est plus résistant que le cobaye et la souris.

Le *diagnostic des affections à tétragène* se fera par l'examen microscopique des produits pathologiques (lequel révèlera d'ordinaire la présence de la tétrade caractéristique) et par les cultures.

Il peut arriver que se pose la question du *diagnostic différentiel avec le staphylocoque*. Beaucoup de caractères sont communs aux deux micro-organismes. La liquéfaction de la gélatine ne saurait constituer un critérium absolument sûr, car il y a des tétragènes qui liquéfient et des staphylocoques qui ne liquéfient pas. La difficulté est encore accrue de ce fait, qu'après quelques ensemencements, le tétragène offre une tendance marquée à perdre sa forme caractéristique, pour revêtir l'aspect banal du staphylocoque. Dans le cas d'un tetragenus aureus, le diagnostic peut devenir particulièrement ardu. Il est donc nécessaire, si l'on conçoit des doutes, de faire des inoculations au cobaye ou à la souris ;

dans le sang et les organes, plus rarement dans le pus, la forme de merista permettra d'éliminer le staphylocoque. Malheureusement, les tétragènes ne sont pas toujours virulents, alors même qu'ils proviennent d'infections humaines graves, voire mortelles. Aussi croyons-nous bon de signaler certaines recherches de MM. Achard et Gaillard, qui pourraient être mises à profit dans les cas difficiles. Ces auteurs ont ensemencé comparativement, dans du sang, le staphylocoque doré, le tetragenus albus (septicus) et le tetragenus aureus ; le premier a liquéfié complètement le caillot, le second partiellement, le troisième n'a amené aucune modification. Ils ont cultivé ensuite les trois microbes dans le lait ; le premier seul l'a coagulé. Ils ont enfin fait bouillir les cultures en lait du tetragenus albus et du tetragenus aureus ; les secondes seules ont coagulé le milieu, résultat dû à leur acidité supérieure à celle du tetragenus albus (bien qu'inférieure à celle du staphylocoque).

AFFECTIONS DUES AU BACILLE PYOCYANIQUE. — BACILLES VERTS FLUORESCENTS

A. *Affections dues au bacille pyocyanique.*

Le rôle pathogène du b. pyocyanique ne se limite pas à la production du pus bleu. Dans la diarrhée de Cochinchine, M. Calmette l'a rencontré chez 15 sujets sur 16 ; à l'autopsie, il existait parfois dans le sang en culture pure. De son côté, M. Gérôme Lartigan a décrit une épidémie de dysenterie, au cours de laquelle le bacille de Gessard fut trouvé à la fois dans les selles et dans l'eau de boisson. Un grand nombre d'auteurs l'ont mis en cause dans certaines infections intestinales graves des nourrissons. M. Kossel, a le premier, attiré l'attention sur le mauvais pronostic des maladies que l'infection pyocyanique vient compliquer. MM. Oleinikow, Vincent et l'un de nous, ont publié des observations de dothiénentérie mortelle, où le microbe du pus bleu se trouvait associé au bacille d'Eberth. Le b. de Gessard a été rencontré également, soit seul, soit en compagnie d'autres microbes, dans des otites, des pneumonies, des péricardites, des méningites..., etc.

Le b. du pus bleu est très répandu dans le milieu extérieur et dans l'organisme normal. On le trouve couramment dans les poussières et les eaux d'alimentation (Pouchet et Bonjean), surtout en certains pays, la Tunisie par exemple (Besson, Remlinger) ; on le trouve souvent aussi dans le tube digestif et sur la peau de l'homme sain. Enfin, l'un de nous l'a isolé

plusieurs fois des voies respiratoires du cheval et de la chèvre, morts de diverses affections.

Principaux caractères du b. pyocyanique.

Caractères morphologiques.

Examiné dans le pus, le b. pyocyanique se présente sous forme de bâtonnets très courts, ovoïdes, que l'on pourrait parfois prendre pour des micrococoques. Ils sont réunis par 2 ou 3 éléments, ou bien forment des amas. Dans les cultures, il s'allonge plus ou moins. Il est très mobile, circonstance due à la présence d'un cil vibratile, situé à l'une de ses extrémités. Il ne forme pas de spores. L'addition de certaines substances aux milieux de culture est susceptible de modifier considérablement sa forme. C'est ainsi que Wasserzug a vu que, cultivé dans du bouillon additionné de $0^{gr},4$ à $0^{gr},5$ d'acide tartrique par litre, le b. de Gessard se présentait sous l'aspect de véritables filaments et parfois même de spirilles. MM. Charrin et Guignard ont constaté de même que l'addition, aux milieux de culture, d'antiseptiques variés, était susceptible de produire des formes allongées, renflées, spirillaires..., etc. Le b. pyocyanique se colore par les différentes couleurs basiques d'aniline. Il ne prend pas le Gram.

Caractères de culture.

Dans le bouillon, le b. du pus bleu se développe rapidement, en déterminant un trouble accentué du milieu ; celui-ci prend une teinte jaune verdâtre, fluorescente, passant au vert par agitation. Il se forme un voile épais à la surface et ce voile se reproduit à plusieurs reprises, lorsqu'on le fait tomber au fond

du tube. Le bouillon dégage une odeur de fleurs caractéristique. Les vieilles cultures présentent en général une couleur jaune brun. Elles sont très alcalines, visqueuses, filantes. Sur la gélatine en plaques, le pyocyanique forme des colonies jaunâtres, plus foncées au centre, avec des bords arrondis ou festonnés. Le milieu est liquéfié rapidement et la zone liquide prend une teinte verte fluorescente. Si on ensemence par piqûre, on voit la liquéfaction commencer au 2e ou 3e jour ; l'entonnoir ainsi formé affecte d'abord un aspect en verre à champagne, puis s'étend rapidement jusqu'aux parois du tube. Sur gélose, apparaît une couche vert sale, qui prend bientôt des reflets nacrés, tandis que le milieu montre une fluorescence verte très accusée. Sur pomme de terre, on obtient un enduit épais, brunâtre ; si on le racle, il verdit à l'air. Sur albumine, le développement s'accompagne d'une belle fluorescence verte. Le lait est coagulé, puis digéré ; le sérum solide, liquéfié.

Caractères biologiques.

Le b. pyocyanique est presque exclusivement aérobie. Il se développe fort mal dans le vide ; certains échantillons même n'y poussent pas du tout. Il se cultive de 15° à 43° ; l'optimum thermique se trouve aux environs de 37°. Il conserve très longtemps sa vitalité dans les cultures. Il est très alcaligène et réduit les nitrates. Ses fonctions les plus intéressantes sont les propriétés pigmentaires, précédemment étudiées.

Caractères d'inoculation.

Le lapin est assez sensible ; M. Charrin le considère même comme l'animal le plus réceptif. Lorsque

l'inoculation est faite dans le tissu cellulaire, il résiste d'ordinaire, à moins qu'on n'emploie un virus exalté ou des doses massives. L'injection intraveineuse détermine la mort en 24 heures ou même moins, si le bacille est très actif ; on retrouve le microbe dans le sang et les organes, surtout les reins. Quand on s'adresse à un virus atténué, la mort est parfois très lente à survenir et les germes disparaissent de l'organisme. On peut constater, dans de tels cas, l'apparition de paralysies du train postérieur ; à l'autopsie, le rein est dur et contracté et le cœur hypertrophié ; la dégénérescence amyloïde n'est point rare.

Pour M. Wassermann, le cobaye est plus sensible que le lapin. L'inoculation sous la peau, à dose convenable, amène la mort en 1-2 jours, avec tuméfaction locale et réaction fébrile. A l'autopsie, on trouve, *loco læso*, un œdème hémorragique ; le b. de Gessard est abondant dans le sang et les organes. L'inoculation à faible dose produit une escarre, suivie ou non de cachexie mortelle. L'injection intrapéritonéale se montre plus sévère ; M. Wassermann, qui se servait il est vrai d'un virus renforcé, a obtenu la mort au bout de 2 jours, avec 1/20 d'anse (l'anse normale des auteurs allemands, ou Normalöse, correspond à environ 2 milligrammes de culture sur gélose). On observe alors du collapsus et de l'hypothermie. Le péritoine est rouge et renferme un exsudat abondant, souvent hémorragique. Le microbe se rencontre dans le sang et les organes.

Le rat et la souris sont également réceptifs. L'injection sous-cutanée d'un bacille isolé des eaux par M. Besson, tuait le rat blanc en 20 à 36 heures, à la dose d'un cinquième de centimètre cube (culture en bouillon). A l'autopsie, le péritoine contenait un exsudat séreux ; l'intestin présentait de nombreuses pla-

ques de Peyer en voie d'ulcération et le microbe se retrouvait dans les organes.

Le pigeon se montre en général réfractaire.

Diagnostic bactériologique des affections dues au b. pyocyanique.

Les conditions dans lesquelles on pourra être amené à rencontrer cet organisme sont loin d'être identiques. La coloration verdâtre des linges de pansement attirera l'attention sur sa présence au cours des suppurations. L'examen microscopique pourra déjà le déceler, en montrant, au milieu des leucocytes et parfois en très grande abondance, un bacille court, mobile, se décolorant par la méthode de Gram. L'isolement se fera d'ordinaire en plaques de gélatine. Ce sont également les plaques qui permettront d'extraire le pyocyanique des selles. Aux autopsies, les ensemencements porteront sur le sang du cœur, les pulpes splénique, hépatique..., etc. Il faut savoir que le b. pyocyanique, fraîchement isolé de l'organisme, est parfois dénué de pouvoir chromogène et qu'il ne récupère celui-ci qu'après un certain nombre de passages *in vitro*. Le mieux est de faire ces passages sur gélose peptonisée à 2 pour 100 et glycérinée à 5 pour 100 (*milieu d'épreuve* de Gessard). On ne saurait en effet porter le diagnostic de b. pyocyanique en l'absence du pigment de Fordos. Quelque voisins qu'en puissent paraître certains bacilles purement fluorescigènes, il n'est nullement légitime de les assimiler au microbe de Gessard, comme on a si souvent voulu le faire. Le pyocyanique donne toujours, soit immédiatement, soit après passages, le colorant bleu caractéristique, *il ne faut point l'oublier*. Ceci nous amène à dire quelques mots des bacilles verts fluorescents.

B. *Bacilles verts fluorescents.*

Les espèces fluorescentes sont, comme on sait, très nombreuses. Depuis 1872, année où Cohn signala pour la première fois la fluorescence chez le b. termo, jusqu'au mémoire de M. Gessard sur la fonction fluorescigène (1892), 24 espèces de bactéries fluorescentes avaient été décrites. Actuellement on en compterait jusqu'à 64, capables de produire le pigment caractéristique (Girou). Les « bacilles verts », comme on les nomme couramment, sont très répandus dans le milieu extérieur. Plusieurs auteurs ont aussi constaté leur présence dans les cavités naturelles de l'homme ou des animaux. Enfin, MM. Koplik, Girou et Étienne ont décrit des pleurésies purulentes à bacilles fluorescents. Nous dirons un mot de deux d'entre ces organismes, le b. de Pottien et le b. viridis.

Bacille de Pottien.

Isolé dans trois cas de choléra nostras. Il est sans doute très voisin du b. pyocyanique. Mais, comme ses propriétés pigmentaires n'ont pas été étudiées en détail, il est impossible de savoir s'il forme ou non de la pyocyanine. Il ne semble se distinguer du microbe de Gessard que par une odeur différente des cultures, par un développement plus maigre dans la gélatine acide et par la présence de capsules, soit en culture soit dans l'organisme des animaux. Il coagule le lait et donne des bulles gazeuses dans la gélose glycérinée. Il tue la souris par inoculation sous-cutanée. Il tue le cobaye par ingestion (méthode de Koch) ; mais, inoculé dans le péritoine, il demeure inoffensif.

Bacillus viridis.

Ou *bacille de Lesage*. C'est l'agent pathogène de la *diarrhée verte infectieuse*. Il existe, comme on sait, chez l'enfant deux sortes de diarrhées vertes, l'une acide, qui donne la réaction des pigments biliaires, l'autre alcaline ou neutre, qui ne fournit pas cette réaction. Cette dernière seule est d'origine microbienne. Le b. viridis produit en bouillon un trouble uniforme, puis il se dépose un sédiment verdâtre. La gélatine, la gélose, la pomme de terre sont rapidement recouvertes d'un enduit crémeux également verdâtre. Le b. de Lesage fournit des acides avec les sucres et coagule le lait. Il est peu pathogène pour les animaux de laboratoire ; cependant, l'ingestion de cultures produit parfois, chez le lapin, une diarrhée verte, dont l'animal ne tarde pas à guérir. Le b. viridis se trouve presque à l'état de pureté dans les selles des enfants atteints de la diarrhée caractéristique. Il est donc très facile de l'isoler, en ensemençant des plaques de gélatine avec une trace de ces selles.

CHOLÉRA

I. *Principaux caractères du vibrion cholérique.*

Caractères morphologiques.

Examiné dans les selles, le vibrion cholérique ressemble à une virgule (fig. 145) ; il affecte en effet la forme de petits articles assez courts, légèrement recourbés. Souvent ces articles sont réunis par deux, de manière à simuler une *s* italique. Dans les cultures, il présente un aspect analogue, mais, en outre, il forme parfois de longs spirilles. Le vibrion cholérique se montre très mobile ; cette mobilité est liée à la présence d'un cil, généralement unique et disposé à une extrémité. L'un de nous a démontré avec M. Morax que certaines variétés vibrionniennes possédaient deux cils à chaque extrémité. Le v. de Koch se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et se décolore par la méthode de Gram. Dans les vieilles cultures, les formes d'involution sont nombreuses ; la transformation en boules (ou granules) est particulièrement fréquente.

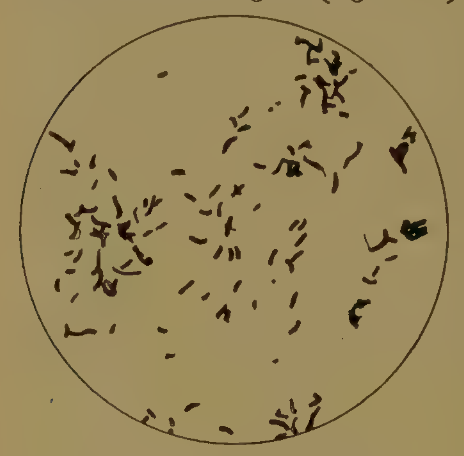


Fig. 145. — Vibrion cholérique.

Caractères de culture.

Le v. de Koch se développe rapidement en bouillon et en eau peptonisée à 1 pour 100. Il commence à troubler ces milieux entre la 10e et la 12e heure et forme à leur surface un voile fragile. Cultivé sur plaques de gélatine, il donne, en 15 à 20 heures, des colonies caractéristiques. Celles-ci apparaissent, au microscope, sous forme de petits disques finement grenus, offrant des bords brillants, quand on éclaire obliquement. Après 48 heures, le centre devient plus sombre et plus grossièrement granuleux ; il est toujours entouré d'un anneau brillant, que circonscrit maintenant un second anneau, plus terne, constitué par une aréole de gélatine liquéfiée. Ultérieurement, la fonte du milieu s'accentue de plus en plus ; la colonie est dissociée en granulations, qui nagent dans le liquide et qui, finalement, se rassemblent au fond du godet liquéfié. Ensemencé par piqûre dans le gélatine, l'organisme cholérique se développe rapidement, surtout au niveau des régions superficielles. Après 24 heures, on y constate la présence d'une cupule à orifice rétréci, emprisonnant une bulle d'air. La liquéfaction augmente ensuite, la bulle disparaît et l'entonnoir (constitué par le milieu fluidifié) devient conique, puis cylindro-conique. Enfin, la colonie tombe au fond de cet entonnoir. Sur gélose en strie, on observe un dépôt blanc, sans caractères spéciaux. Les ensemencements en plaques de gélose fournissent de petites colonies, transparentes, de couleur grisâtre. Sur pomme de terre, on obtient une culture café au lait, peu abondante ou nulle si le milieu est trop acide. Le sérum coagulé est liquéfié. Le lait est coagulé, au moins dans la majorité des cas.

Caractères biologiques.

Le microbe du choléra est surtout aérobie. Il pousse à partir de 16° ; l'optimum thermique oscille autour de 37°. Cultivé dans le bouillon, ou mieux dans l'eau peptonisée, il réduit les nitrates, pour donner naissance à des nitrites et engendre aussi de l'indol. Cette double production se traduit par la coloration rouge que prennent les cultures sous l'influence de l'acide sulfurique (on choisira, bien entendu, un réactif exempt de produits nitreux). C'est ce qu'on appelle la *réaction indol-nitreuse.*

Le vibrion de Koch est susceptible de faire fermenter les sucres, le glucose principalement ; puis, par ordre décroissant, le sucre de canne, le maltose et le lactose, (Kuprianow, Gosio). La fermentation est directement proportionnelle à la quantité de sucre et en raison inverse de la quantité de peptone. Il se forme des acides lactique, acétique et butyrique.

Un certain nombre de microbes ont une influence marquée sur la croissance *in vitro* du vibrion cholérique. C'est ainsi que le b. pyocyanique, un coccus blanc, un autre coccus, isolé des déjections du cobaye, et un b. liquéfiant, trouvé dans l'intestin de l'homme et du cobaye, jouent, par rapport à l'organisme de Koch, le rôle de microbes empêchants. Inversement, la torula alba et une sarcine jaune isolées de l'air, une autre torula, une autre sarcine et un bacille coliforme, isolés de l'estomac humain, favorisent nettement le développement (Metchnikoff).

Le vibrion cholérique se laisse agglutiner par le sérum des malades atteints de choléra et par celui des animaux immunisés, ou même simplement infectés.

Caractères d'inoculation.

Une distinction s'impose entre le choléra expérimental vrai et des lésions banales non spécifiques. Il y a *choléra vrai* (Metchnikoff), lorsqu'à la suite de l'ingestion d'une quantité minime de culture, les animaux présentent tous les signes de la maladie humaine. Si, au contraire, il est nécessaire, pour infecter l'animal, de lui faire ingérer une forte dose, d'user de certains artifices ou d'employer une autre voie que la voie digestive, on ne peut pas dire qu'il s'agisse de choléra vrai ; c'est, suivant le cas, une entérite ou une péritonite non spécifiques, ou bien une septicémie sans caractères spéciaux.

Chez le cobaye, l'inoculation intrapéritonéale de cultures est rapidement suivie d'hypothermie, d'apathie et de hérissement des poils. La mort survient au bout de 12 à 24 heures, selon la virulence du microbe et la quantité injectée. A l'autopsie, on constate un épanchement péritonéal, contenant un grand nombre de vibrions ; il existe de l'hyperémie des anses intestinales ; enfin, les microbes passent dans l'intestin 83 fois sur 100 (Sobernheim) et se rencontrent souvent dans le sang, bien qu'en nombre modéré.

On peut, à l'exemple de MM. Nicati et Rietsch, introduire la culture directement dans le duodénum, après laparotomie. On peut aussi, suivant la méthode de M. Koch, l'injecter à la sonde dans l'estomac (après *neutralisation* de son contenu par injection intragastrique de 5 centimètres cubes de bicarbonate de soude à 5 pour 100 ; et *arrêt du péristaltisme intestinal,* par injection intrapéritonéale de 1 centimètre cube de teinture d'opium pour 320 grammes d'animal). Après avoir ainsi introduit dans l'estomac

10 centimètres cubes de culture en bouillon, par exemple, on observe, au bout de 24 heures, de la faiblesse des membres postérieurs, du ralentissement de la respiration, de l'hypothermie et du collapsus. A l'autopsie, l'intestin grêle est distendu par des selles riziformes ; les vibrions s'y rencontrent en culture presque pure. On tue ainsi 70 à 80 pour 100 des animaux. C'est plutôt, avons-nous dit, une entérite qu'un vrai choléra.

Treize fois sur dix-neuf, chez les cobayes nouveau-nés, l'ingestion simultanée des vibrions et des trois derniers microbes favorisants indiqués plus haut (torula, sarcine, b. coliforme) amène de la faiblesse, de la cyanose, parfois de la diarrhée, enfin de l'hypothermie et la mort (Metchnikoff). A l'autopsie, les lésions sont moins intenses que dans le choléra vrai des jeunes lapins (*ubi infra*). Il ne se produit rien de semblable chez les cobayes adultes. Enfin, la mort du cobaye peut également s'observer à la suite de l'injection sous-cutanée ou intravasculaire, mais les symptômes et les lésions n'ont alors rien de caractéristique.

Les lapins adultes sont complètement réfractaires au choléra vrai. Chez les lapins nouveau-nés, on arrive, souvent avec certains vibrions (v. de Massaouah) et toujours avec d'autres (v. de Constantinople), à déterminer un choléra mortel, sans le secours de microbes favorisants. Quand on est obligé de recourir à ces microbes, on obtient, 10 fois sur 11 environ, une affection type, qui tue en 36 ou 48 heures. Les signes en sont : de la diarrhée dans la majorité des cas, de l'hypothermie, de la cyanose et de l'anurie. A l'autopsie, on trouve l'intestin congestionné, et distendu par un liquide inodore, grumeleux, incolore ou jaune clair. Les vibrions, rares dans l'estomac, se montrent presque en culture pure dans l'intestin.

On les rencontre aussi dans la bile (1/2 des cas), dans le foie (1/3 des cas) et dans le sang (1/5 des cas). Les microbes favorisants disparaissent vite de l'organisme et ne donnent donc pas lieu à une infection mixte.

Chez le lapin, comme chez le cobaye, on peut amener la mort à la suite de l'injection intraveineuse, intrapéritonéale, et même sous-cutanée, si la dose et la virulence du microbe employé sont suffisantes. Les vibrions peuvent se retrouver à l'autopsie dans l'intestin, plus rarement dans le sang. Les symptômes observés pendant la vie, ainsi que les lésions constatées à l'autopsie, n'ont rien de caractéristique.

Chez le jeune chien (Karlinski, Gamaleïa) et le jeune chat (Karlinski, Wiener) on a pu reproduire le choléra vrai. Le spermophile, même adulte, prend l'affection avec la plus grande facilité (Zabolotny). Enfin, nous savons déjà que le choléra a été provoqué chez l'homme par M. Metchnikoff et d'autres expérimentateurs.

La souris se montre assez sensible aux vibrions, le pigeon beaucoup moins.

Répartition du vibrion de Koch dans l'organisme des cholériques.

Si, chez l'animal, il n'est pas rare de constater la présence des vibrions dans le sang et les viscères, il n'en va pas de même chez l'homme, où l'agent pathogène demeure presque toujours confiné à l'intestin. On le rencontre parfois dans les matières vomies, mais il n'a été trouvé que rarement en dehors du tube digestif. Les vibrions existent dans les selles dès le début de l'affection et peuvent y persister plus ou moins longtemps. Tantôt, ils se montrent presque à l'état de culture pure, d'autres fois, ils restent en

nombre plus ou moins modéré. Dans les cas légers, ils disparaissent quelquefois assez rapidement des déjections et échappent ainsi à l'observation, si celle-ci n'est pas pratiquée à temps. Nous devons ajouter que des vibrions, plus ou moins semblables à l'organisme de Koch, ont été rencontrés par un grand nombre d'auteurs dans les selles de malades indemnes de choléra et même dans les selles de personnes saines. Ces faits sont de nature à rendre un peu délicat le diagnostic de l'affection, surtout en dehors des milieux épidémiques.

II. *Diagnostic bactériologique du choléra.*

A. **Diagnostic sur le vivant.** — On emploiera concurremment le sérodiagnostic et la recherche des vibrions dans les selles.

1° Sérodiagnostic. — Le sérum du malade suspect sera prélevé comme nous l'avons indiqué au sujet de la fièvre typhoïde et mélangé, dans la proportion de 1/10 à 1/15, à une culture jeune de vibrions cholériques. Aux cultures en bouillon, on substituera ici (en raison de la présence du voile) les cultures sur gélose, émulsionnées dans l'eau physiologique. La réaction doit avoir lieu au bout de 5 à 60 minutes. Si donc elle ne s'est pas produite, de façon manifeste, après une heure, on la considérera comme négative. Sur 14 cas examinés, MM. Achard et Bensaude ont constaté 13 fois l'agglutination des vibrions cholériques ; le pouvoir agglutinant du sérum apparaît dès le deuxième et même parfois dès le premier jour de la maladie. Toutefois, il n'existe encore, à notre connaissance, aucun travail confirmatif de celui des deux auteurs précédents.

2° Recherche des vibrions dans les selles. — On recueille dans des vases stériles, autant que

possible, les premières selles rendues par les malades. On pourra administrer un lavement, pour hâter le diagnostic ; il faudra alors se servir d'un instrument stérilisé et surtout d'eau stérilisée (l'ébullition suffit en rigueur). Les selles recueillies seront immédiatement soumises à l'examen microscopique et ensemencées.

Examen microscopique. — Étaler une trace de matière, de préférence un grain riziforme s'il s'en trouve, à la surface d'une ou deux lames et colorer rapidement par le violet de gentiane phéniqué. Quand il s'agit de choléra, on rencontre, d'ordinaire, un nombre plus ou moins considérable de vibrions, reconnaissables à leur forme virgulaire, souvent à leur forme en S et à leur teinte plus pâle que celle des autres bactéries des selles. Celles-ci consistent en bacilles (colibacille principalement), en cocci et en fins spirilles à peine teintés. Ces spirilles ne sont pas constants mais ils se montrent très fréquemment ; on ne les confondra pas avec les vibrions.

Cultures. — On commencera par recueillir un peu des déjections dans une ampoule scellée. Celle-ci sera conservée à l'abri de la lumière et de la chaleur. Grâce à cette précaution, on pourra faire au besoin un nouvel examen les jours suivants.

Si le microscope a montré de nombreux, ou même d'assez nombreux vibrions dans les selles, on diluera celles-ci dans l'eau stérilisée et, avec la dilution, on fera des séparations sur gélose (2 ou 3 tubes, ou une plaque). Si les vibrions étaient au contraire peu abondants ou douteux, on ensemencera en même temps 4 à 5 tubes d'eau peptonisée à 1 pour 100, salée à 1 pour 100 et gélatinée à 2 pour 100.

Sur les tubes ou les plaques de gélose, mis à l'étuve à 37°, se développent, en 8 à 10 heures, des colibacilles, des vibrions et souvent des streptocoques. Les autres espèces de l'intestin sont rares, ou tout au

moins ne se rencontrent qu'à l'état d'unités. Laissant de côté les colonies larges, toujours irrégulières, opaques, plus épaisses au centre, qui répondent au colibacille et les colonies fines, punctiformes, transparentes, caractéristiques du streptocoque, on prélèvera les colonies moyennes, demi-transparentes, arrondies, régulières, qui sont dues aux vibrions. L'examen microscopique montrera du reste s'il s'agit ou non d'organismes virgulaires. Dans l'affirmative, on ensemencera les divers milieux réactifs du vibrion cholérique.

Dans les tubes d'eau peptonisée (mis également à l'étuve à 37°), on surveillera l'apparition d'un voile superficiel, ou, mieux encore, on commencera, à partir de la 6e heure, à examiner la surface du liquide. Si les vibrions sont suffisamment abondants, on fera des isolements sur gélose, après dilution ; s'ils sont rares, on pratiquera un nouveau passage dans 4 ou 5 tubes d'eau peptonisée. On se servira, pour cela, de la culture où les vibrions étaient les moins rares. S'ils font défaut, on recommencera l'épreuve avec de nouvelles selles, ou, en leur absence, avec les selles conservées dans l'ampoule scellée.

Les vibrions étant isolés à l'état de pureté, on fera bien de commencer par les soumettre au criterium du cholérasérum (expérimental). On étudiera ensuite leurs autres caractères. Si le vibrion isolé est pathogène et que le cholérasérum immunise contre lui, la nature cholérique est certaine. De même, et plus simplement, si le vibrion (pathogène ou non) est agglutiné *in vitro* par le sérum. Bien entendu, si on peut expérimenter sur de jeunes lapins et que le vibrion, avec ou sans le secours de microbes favorisants, provoque un choléra type, ses propriétés cholérigènes sont absolument indéniables.

B. **Diagnostic sur le cadavre.** — Sur le cadavre, on prélèvera aseptiquement le contenu intestinal, en

choisissant de préférence les points congestionnés (plaques hortensia). Parfois, les malades succombent rapidement et leur autopsie n'est pas possible. Il faut alors pratiquer, avec le plus grand soin, l'examen des linges qui ont pu être souillés par les déjections et même par les vomissements, bien que ceux-ci contiennent rarement le vibrion cholérique.

Il est inutile de dire quelle importance présente le diagnostic bactériologique du choléra, en présence de tout cas suspect, dans un pays menacé. Il a une grande importance également au déclin des épidémies et un certain temps après celles-ci (rechutes).

III. *Races du vibrion cholérique.*

Il faut savoir qu'au cours des épidémies on peut rencontrer des vibrions de nature incontestablement cholérique, mais offrant des différences parfois sensibles avec l'organisme type de Koch, que nous avons eu précédemment en vue. Ces différences portent, exclusivement ou à la fois, sur la forme, les caractères de culture, les propriétés biologiques et le pouvoir pathogène.

Forme. — Il est des vibrions allongés, porteurs de deux cils à chaque extrémité ; nous en avons déjà parlé — il en est d'autres, vraiment bacillaires — enfin, on en rencontre de presque cocciformes.

Caractères de culture. — L'aspect des cultures en gélatine varie énormément ; le développement sur pomme de terre peut faire défaut ; le lait n'est pas toujours coagulé.

Caractères biologiques. — Certains vibrions ne poussent pas à 37°, certains ne donnent point la réaction indol-nitreuse.

Pouvoir pathogène. — A côté d'organismes avi-

rulents, on en trouve qui tuent le pigeon par septicémie, à la manière du vibrio Metchnikowii.

On a beaucoup discuté sur la nature cholérique de certaines races ; si l'on a affaire à de pareilles anomalies, on recourra aux divers criteriums que nous avons indiqués. Toutefois, quels que soient les caractères d'un vibrion, lorsqu'il occasionne une épidémie authentique, on ne saurait raisonnablement nier sa nature cholérique.

IV. *Vibrion de Finkler et Prior.*

Rencontré à plusieurs reprises dans des cas de *choléra nostras*. Beaucoup d'auteurs refusent de le considérer comme un vrai vibrion cholérique. Il est bon, en tous cas, de connaître les particularités qui le distinguent.

C'est un organisme plus épais que celui de Koch, unicilié et très polymorphe (d'où son nom de *vibrio proteus*). Il donne une abondante culture sur pomme de terre et coagule le lait. La réaction idol-nitreuse n'apparaît qu'après plusieurs jours. Enfin, il liquéfie la gélatine avec une grande rapidité ; aussi sert-il de *type courant* dans les recherches sur les enzymes protéolytiques des bactéries.

Le vibrion de Finkler et Prior est pathogène pour le pigeon ; il le tue par inoculation intramusculaire.

V. *Vaccination anticholérique.*

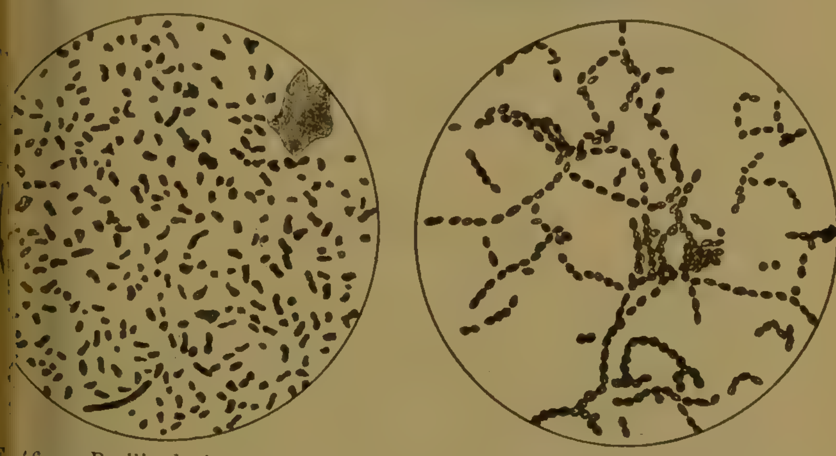
On sait que M. Ferran, puis M. Haffkine ont pratiqué un nombre considérable de vaccinations anticholériques, avec des cultures stérilisées par la chaleur. Les résultats de ces vaccinations ont été diversement appréciés. L'opinion courante, dans les Indes, leur est très favorable.

PESTE

I. *Principaux caractères du bacille de Yersin.*

Caractères morphologiques.

Le bacille de la peste est un bâtonnet court, trapu, à bouts arrondis. Il appartient au type cocco-bacille, et se rapproche incontestablement des pasteurellœ. Il



F[ig. 1]46. — Bacille de la peste. Culture sur gélose (Netter).

Fig. 147. — Bacille de la peste. Culture en bouillon (Netter).

se multiplie très rapidement dans les milieux favorables et peut présenter alors l'image d'un coccus. Il forme parfois des bâtonnets assez longs sur les milieux solides (fig. 146), tandis qu'il apparaît habituellement sous forme de chaînettes (strepto-bacilles) dans les liquides (fig. 147). Il offre une grande tendance à produire des types d'involution, notamment

de grosses cellules arrondis, assez comparables à des cellules de levure. Sur gélose additionnée de 2 à 3 pour 100 de chlorure de sodium, cette apparence est très fréquente (fig. 148). Le bacille de la peste est immobile et ne forme pas de spores. Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline ; dans les colorants faibles, la partie centrale se teinte souvent à peine, d'où l'*aspect* dit *en navette*. Il se décolore par la méthode de Gram.

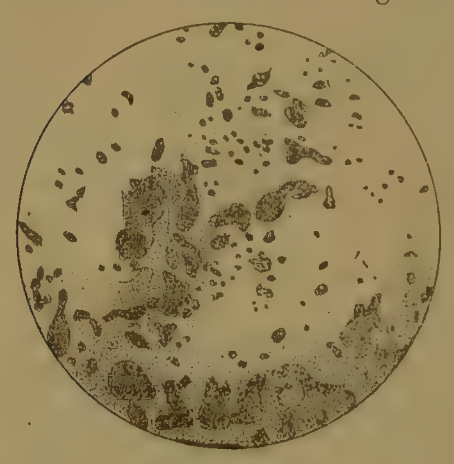


Fig. 148. — Bacille de la peste. Formes d'involution, sur gélose salée (Netter).

Caractères de culture.

Le bouillon ordinaire et le bouillon Martin conviennent très bien au développement. Habituellement, le milieu nutritif reste clair et tient en suspension de petits grumeaux, qui tombent ensuite au fond du tube. Après quelques jours, apparaît le plus souvent un voile superficiel, surtout lorsque la température n'est pas trop élevée. Cet aspect est tout à fait caractéristique. Parfois le bouillon se trouble plus ou moins. Il semble qu'il y ait là une simple question d'ensemencement. Le milieu, ensemencé avec une parcelle de culture sur gélose, reste clair ; il se trouble, au contraire, si on a ensemencé une goutte de culture en bouillon (Abel). Lorsqu'avec M. Haffkine, on verse un peu de beurre ou d'huile, à la surface du

liquide, les microbes, très aérobies et maintenus à la surface, s'y développent exclusivement. Les îlots ainsi formés adhèrent aux particules grasses et pendent dans le liquide sous forme de stalactites.

Le développement est très abondant sur gélose (glycérinée ou non) ; il se produit le plus souvent une couche visqueuse. En plaques de gélatine, on voit apparaître des colonies jaunâtres, puis brunâtres, granuleuses au microscope. Elles sont rondes dans la profondeur, assez irrégulières à la surface, où elles ressemblent un peu à des colonies de bacille typhique. Par piqûre, on obtient une traînée blanchâtre sans caractère. Le milieu n'est pas liquéfié.

Sur pomme de terre, la culture est grisâtre, sèche, maigre ; elle peut même faire défaut. Le bacille de la peste se développe dans le lait, qu'il ne coagule pas, et dans le petit lait de Petruschky. Le sérum, coagulé ou liquide, convient également, mais il ne constitue pas un milieu électif.

Caractères biologiques.

Le bacille de Yersin est presque exclusivement aérobie. On peut obtenir des cultures à l'abri de l'air, mais alors le développement reste insignifiant. La température optima est de 30° environ ; toutefois, circonstance très précieuse pour les isolements, le microbe se développe à des températures beaucoup plus basses, à 15°-20° par exemple. On a pu obtenir même des cultures à 4° ; elles sont, il est vrai, très tardives (Pfeiffer). Si l'on ensemence le bacille de la peste dans du lait additionné de tournesol bleu, le milieu vire au rouge. Le bacille donne donc naissance à des acides ; ceux-ci n'ont pas été déterminés au point de vue chimique. Par contre, on n'observe jamais de fermentation appréciable. Le b. de Yersin

ne forme pas d'indol. Il est tué par insolation au bout de 3 ou 4 heures (Kitasato). Une température de 50° à 60° le fait périr très rapidement. L'acide phénique à 5 pour 100 le détruit en une minute, le chlorure de chaux à 1/100 en 15, etc... c'est donc un organisme fort délicat.

Caractères d'inoculation.

Les animaux les plus réceptifs sont le cobaye, le rat et la souris. L'inoculation d'une culture active, sous la peau du cobaye, produit un œdème local considérable. Les ganglions voisins s'hypertrophient rapidement. Après 24 heures, l'animal offre de l'anorexie et ses poils se hérissent; puis, il tombe sur le côté et finalement est pris de convulsions qui durent jusqu'à la mort. Celle-ci survient au bout de 2 à 5 jours. A l'autopsie, on trouve un œdème rosé, qui s'étend au loin et de l'hypertrophie ganglionnaire. Les intestins et les capsules surrénales sont congestionnés ; les reins et le foie violacés. La rate est énorme et présente souvent une éruption miliaire caractéristique. Une culture moins virulente engendre une tuméfaction énorme des ganglions, suivie de suppuration. Un mode excellent d'inoculation est la voie intra nasale, employée par MM. Roux et Batzarow. Le microbe se cultive d'abord dans le mucus nasal ; il se propage ensuite de proche en proche et détermine une broncho-pneumonie, toujours mortelle. L'animal peut être infecté aussi par voie conjonctivale. L'injection dans le péritoine entraîne la formation d'un exsudat purulent et de nodules pesteux dans le foie et la rate. On peut tuer également les animaux par ingestion.

MM. Weichselbaum Albrecht et Ghon ont établi qu'on infecte aisément le cobaye par inoculation à la

surface de la peau rasée. On voit apparaître alors de la rougeur, puis une vésicule remplie de bacilles. Après quelques jours la mort survient, précédée de tuméfaction ganglionnaire. A l'autopsie, on rencontre une induration du tissu cellulaire *loco læso* et fréquemment un cordon purulent allant vers les ganglions. Le plus souvent le microbe est présent dans le sang. La rate et parfois les poumons offrent les nodules caractéristiques. Ce mode d'inoculation est infiniment plus sûr que la voie sous-cutanée.

Le rat meurt, suivant les cas, en 2 à 4 jours. On peut l'infecter par le nez ou par la conjonctive ; c'est le moyen le plus sûr (Roux). La piqûre à la patte est ordinairement suivie d'une affection rapide et l'animal succombe à la septicémie ; si la mort tarde un peu, on observe des bubons énormes et une éruption miliaire sur le foie et la rate. MM. Hankin et Löffler ont contaminé les animaux par ingestion. Ce procédé, qui a donné des résultats négatifs à M. Simond, vient de réussir 48 fois sur 60 entre les mains de M. Kolle.

La souris périt au bout de 1 à 3 jours. Les effets de l'inoculation sont les mêmes chez elle que chez le rat.

Dans les Indes, les singes gris à poils longs et à longue queue (semnopithèques) sont très sensibles, les singes bruns à queue courte (macaques) le sont moins. Chez les deux espèces, 1 à 2 jours après l'inoculation sous-cutanée (pratiquée au bras), on observe de la fièvre, puis un œdème local et un bubon axillaire. L'animal périt en 4-5 jours. Si l'infection a été déterminée par piqûre, à l'aide d'une aiguille trempée dans le virus, l'œdème local fait défaut. Si on introduit le virus dans la trachée, les animaux contractent une broncho-pneumonie pesteuse. Contrairement à l'opinion de certains auteurs, l'infection

intestinale serait impossible à réaliser (Wyssokowitch-Zabolotny).

Le lapin est moins réceptif que les animaux précédents. L'évolution reste toujours plus lente et une grande quantité de virus devient nécessaire pour faire périr les animaux. L'inoculation sous-cutanée tue rarement en moins de 4 à 7 jours.

Le chat, infecté par ingestion, meurt dans la moitié des cas (Kolle). L'inoculation sous la peau donne un abcès à pus stérile. On obtient des abcès analogues chez la chèvre, la vache, la brebis (Wilm). La poule et le pigeon peuvent succomber à la suite de l'injection intraveineuse de cultures très virulentes, surtout si on les fait jeûner (di Mattei).

Le cheval est réceptif ; d'où la nécessité de procéder prudemment quand on prépare le sérum antipesteux.

Distribution du bacille de Yersin dans l'organisme humain.

Le bacille de Yersin se rencontre avant tout dans les bubons. Il y diminue au bout de quelque temps et disparaît quand la suppuration se manifeste. Il est constant également dans la rate et le système lymphatique, presque constant dans les phlyctènes et les charbons. On le trouve dans le sang du cadavre, mais il s'y montre généralement peu abondant. Sur le vivant, il n'apparaît guère dans la circulation que lors des cas graves. Il peut passer dans l'urine, surtout lorsque celle-ci est albumineuse. Il existe souvent dans les crachats sanguinolents qui trahissent une complication broncho-pulmonaire. Il est constant et d'ordinaire très abondant dans les crachats de la pneumonie pesteuse *primitive*. Enfin, il se rencontrerait fréquemment, d'après M. Wilm, dans les vo-

missements et les fèces, opinion contestée par les autres auteurs.

II. *Diagnostic bactériologique de la peste.*

Le diagnostic bactériologique de la peste peut se faire dans deux circonstances différentes : *chez l'animal* et *chez l'homme*.

1° **Chez l'animal.** — Le *rat*, la *souris* et l'*arctomys* sont atteints naturellement de la peste et on sait que les épizooties sévissant sur ces rongeurs précèdent souvent les épidémies humaines. Il y a donc un grand intérêt à faire le diagnostic de la maladie chez ces animaux. A l'autopsie d'un rat ou d'une souris morts de la peste, on trouve le plus souvent des bubons volumineux, surtout à l'aisselle et à l'aine. La rate est hypertrophiée et rouge, le tube digestif hyperémié. Dans l'immense majorité des cas, la rate contient des quantités énormes de bacilles pesteux ; c'est sur elle qu'il convient surtout de faire porter les recherches, mais on ne devra pas négliger le contenu des bubons. On colorera donc des frottis de rate ou de ganglion à la thionine et on y cherchera les cocco-bacilles caractéristiques. Ils forment parfois des amas très nombreux et présentent l'aspect en navette, quand on évite toute surcoloration (fig. 149). On fera toujours une préparation de contrôle par la mé-

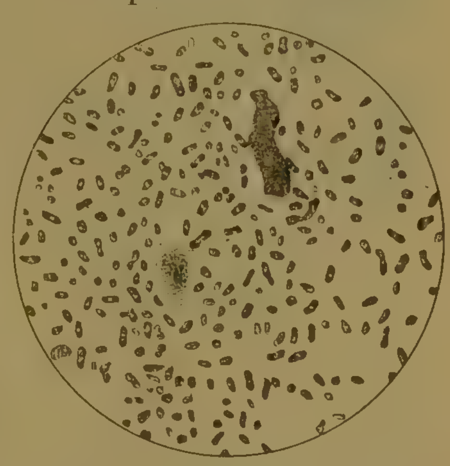


Fig. 149. — Bacille de la peste. Pulpe de rate de rat.

thode de Gram. Les pulpes splénique et ganglionnaire seront également ensemencées en bouillon et sur gélose. En bouillon Martin et à 30° on aura, en moins de 20 heures, l'aspect caractéristique que nous avons décrit. La gélose sera précieuse pour les isolements. Enfin, les produits suspects seront inoculés, après dilution, sous la peau du rat, de la souris ou du cobaye. Chez ce dernier animal on aura souvent recours, avec avantage, aux inoculations dans les narines ou sur la peau, dont les effets ont été déjà décrits.

2° **Chez l'homme.** — *a*) *Pendant la vie.* — La façon d'opérer diffère un peu suivant que le malade est atteint d'une des 3 formes sous lesquelles peut se manifester la peste : *bubonique, septicémique* ou *pneumonique.*

Les *bubons* seront ponctionnés et les microbes recherchés sur des préparations de pulpe colorées à la thionine (fig. 150). Il faut savoir que les coccobacilles sont souvent peu abondants ; ils peuvent même avoir disparu, avons-nous dit, lorsque le bubon est suppuré. Il faut alors faire, en bouillon et sur gélose, des ensemencements très copieux et inoculer le pus aux animaux à fortes doses. Le b. de Yersin pourra être recherché aussi, suivant les cas, dans les phlyctènes, les charbons et la salive.

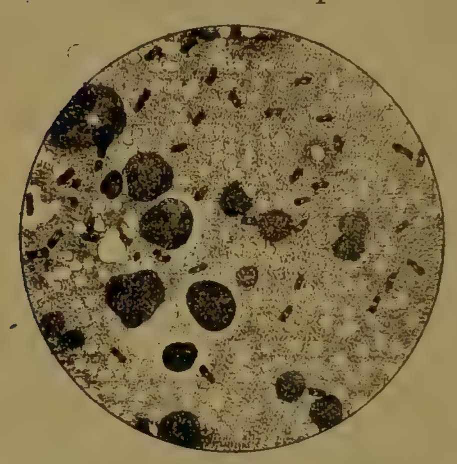


Fig. 150. — Bacille de la peste. Suc d'un bubon (Netter).

Dans la *forme septicémique,* l'examen du sang fait tout à la fois le diagnostic et le pronostic. A Oporto,

on a vu cependant guérir, grâce au sérum, une malade dont une seule goutte de sang avait donné jusqu'à 32 colonies de bacilles de Yersin.

Les crachats, dans la *forme pneumonique,* seront d'abord examinés au microscope ; on y rencontrera d'ordinaire de nombreux coccobacilles. A cause de la présence fréquente du pneumocoque, on préférera, comme réactif expérimental, le cobaye à la souris. Pour le même motif, on s'adressera, lors des isolements, aux plaques de gélatine plutôt qu'à celles de gélose. D'une façon générale, quand on aura à examiner des *produits très impurs* on devra toujours recourir à la méthode de Weichselbaum et de ses élèves (inoculation sur la peau rasée du cobaye) ; elle a permis récemment à M. Kolle d'isoler le bacille d'Yersin des fèces et des liquides et tissus putréfiés. Elle n'est toutefois pas de mise avec le rat et la souris ; avec le jeune lapin, elle réussit dans les 3/5 des cas.

La valeur pratique du *sérodiagnostic* ne semble pas encore bien établie. Pour M. Zabolotny, le pouvoir agglutinant n'apparaît que vers la deuxième semaine. Pour divers auteurs il serait, de plus, inconstant. Par contre, M. Leumann l'aurait observé dans 39 cas sur 40, parfois dès le 5e jour. Quoi qu'il en soit, le sérum des pestiférés ne paraît guère agglutiner à plus de 1/15 à 1/20.

b) *Après la mort.* — L'examen anatomo-pathologique du cadavre mettra souvent sur la voie du diagnostic. Les ganglions malades entourés d'un œdème gélatineux très spécial, sont fréquemment soudés les uns aux autres, formant de volumineux paquets. A la section, le tissu présente une couleur lie de vin. Les îlots de pneumonie lobulaire sont presque constants. On constate de la congestion, parfois hémorragique, du tube digestif. La tuméfaction et même l'érosion des plaques de Peyer ne sont pas rares.

Enfin, on note de l'hypertrophie de la rate, des taches jaunâtres dans le tissu hépatique et des lésions de néphrite, souvent accompagnées d'hémorragies sous-capsulaires. Dans les formes pneumoniques les altérations sont en général très intenses.

On prélèvera un ganglion et on fera des frottis sur lames, des ensemencements et des inoculations. De même pour la rate. Le sang, où le microbe est toujours moins abondant, sera exclusivement cultivé. Dans le cas de peste pneumonique, les examens porteront naturellement sur le suc du poumon. S'il était impossible de pratiquer l'autopsie complète, on se contenterait d'enlever un ganglion, ou tout au moins d'en aspirer la pulpe.

III. *Prophylaxie de la peste.*

Nous ne pouvons que la *résumer* dans ses points essentiels, mais elle doit être très bien connue des bactériologues. On s'efforcera de détruire préventivement les rats, par le virus Danysz ou les moyens chimiques. On les surveillera attentivement et on soumettra ceux qui seront trouvés morts à un minutieux examen bactériologique (*ubi supra*). Rappelons qu'il est indiqué de les asperger d'eau bouillante avant de les ramasser, afin de détruire les puces qu'ils peuvent recéler sur leur corps. Lors du premier cas suspect, observé chez l'homme, on s'attachera à obtenir un diagnostic certain, par les moyens indiqués. On isolera le malade, qui sera traité par le sérum ; on isolera aussi son entourage, auquel on injectera du sérum et que l'on soumettra à une quarantaine de 10 jours. On évacuera la maison et au besoin les maisons voisines ; tous les objets contenus dans ces maisons seront désinfectés, ainsi que les locaux eux-mêmes. Dans les immeubles, désormais

vides, on fera une guerre acharnée aux rats et aux souris. Une fois l'épidémie déclarée, on recherchera les cas suspects avec soin ; on enverra les malades dans des hôpitaux spéciaux et leur entourage dans des locaux d'isolement. La vaccination en grand, par le procédé d'Haffkine, se trouve alors indiquée. Les navires suspects seront mis en quarantaine. Enfin, en présence d'un navire contaminé, on isolera les malades, on transportera les passagers et l'équipage dans un lazaret et on désinfectera le navire au large. Les rats y seront détruits par les gaz asphyxiants (SO^2, CO^2).

IV. *Vaccination par la méthode d'Haffkine.*

M. Haffkine inocule son vaccin, au bras, aux doses suivantes :

Chez l'homme.	3 à 3,5	cent. cubes.
Chez la femme.	2 à 2,5	—
Chez les enfants au-dessus de 10 ans.	1	—
Chez les enfants plus jeunes. . .	0,1 à 0,3	—

La vaccination est suivie de quelques phénomènes généraux, d'une douleur et d'une tuméfaction locales, et souvent d'un léger retentissement ganglionnaire. Le tout dure 12 à 24 heures. Lorsque la réaction s'est montrée trop faible, on conseille de recommencer l'inoculation après 10 jours.

M. Calmette propose de substituer le procédé suivant à celui d'Haffkine. On injecte 5 centimètres cubes de sérum et, 2-3 jours après, 2 centimètres cubes de culture stérilisée. On produit ainsi, successivement, l'immunité passive et l'immunité active. Le sérum permet d'obtenir un état réfractaire immédiat et, de plus, réduit à leur minimum les phénomènes engendrés par les bacilles morts.

V. *Sérothérapie.*

Préventivement. — En injectant 10 centimètres cubes, on produit une immunité transitoire, qui dure 10 à 15 jours.

Curativement. — On doit commencer le traitement le plus tôt possible. On injectera d'emblée 20 centimètres cubes sous la peau, ou mieux dans les veines (Calmette). Si aucune amélioration ne s'est montrée le lendemain, on administrera encore 20 centimètres cubes. Puis, on continuera les jours suivants (en diminuant les doses), jusqu'à disparition de la fièvre, quelquefois même un peu plus tard, lorsque l'on craint une rechute. Dans les cas graves ou anciens, on se trouvera bien d'atteindre 40 centimètres cubes par jour, au moins au début.

L'inoculation intraveineuse se pratique aisément au niveau des veines du dos de la main ou de la face antérieure du poignet. On injecte le sérum lentement (20 centimètres cubes en 3 à 4 minutes), après l'avoir fait tiédir. S'il contient des flocons (coagulations secondaires), on le passe préalablement sur une mousseline stérile.

LÈPRE

I. *Principaux caractères du bacille de la lèpre.*

Le bacille de la lèpre, ou *bacille de Hansen*, est très voisin, comme *forme*, *dimensions*, et *réactions colorantes*, du bacille de la tuberculose. Il se teinte par la méthode d'Ehrlich et par la méthode de Gram. Dans ce dernier cas, il présente, ainsi que le bacille de Koch, un aspect granuleux, résultant de la succession de zones claires et de zones colorées. Sur des préparations récentes, il se colore, plus rapidement que le bacille tuberculeux, par la fuchsine et les violets et il résisterait plus longtemps que lui à la décoloration par l'acide azotique. M. Baumgarten a utilisé cette dernière propriété pour différencier les deux micro-organismes. Un séjour de 5 minutes dans le violet aniliné, avec décoloration consécutive par l'acide azotique à 1/10, laisserait la bacille de Hansen parfaitement teinté, tandis que le b. de Koch aurait perdu sa coloration. La plupart des auteurs n'admettent pas la valeur de la réaction de Baumgarten. En tout cas, rappelons que, dans les pièces fixées par les réactifs ordinaires, le bacille lépreux perd très vite sa colorabilité, contrairement à ce qui arrive pour le bacille tuberculeux. Le microbe de Hansen est immobile et ne forme pas de spores.

Les *tentatives de culture* ont échoué jusqu'ici. Les résultats positifs, annoncés à différentes reprises par les auteurs (Bordoni-Uffreduzzi, Babès, Ducrey, etc.), se rapportent au b. de Koch ou à des orga-

nismes vulgaires d'association. Récemment cependant, M. Spronck serait parvenu à cultiver le bacille de la lèpre en ensemençant, sur des pommes de terre glycérinées et neutralisées, des lépromes obtenus par biopsie. Le microbe de Spronck serait agglutiné très nettement par le sérum des lépreux. Ces assertions demandent à être confirmées.

Les *tentatives d'infection*, pratiquées chez les animaux les plus divers et par les voies les plus variées, ont toujours échoué, elles aussi. M. Spronck n'a pas été plus heureux avec son bacille. Enfin, on a tenté nombre de fois d'inoculer la lèpre à l'homme ; aucune des observations produites n'est à l'abri des objections.

Le bacille de Hansen ne se cantonne pas exclusivement dans la peau et dans les nerfs, ainsi qu'on l'a cru pendant longtemps. On sait aujourd'hui que la *généralisation aux organes internes* constitue une règle qui se vérifie presque toujours. L'autopsie des sujets qui ont succombé à une maladie intercurrente prouve que les viscères peuvent être envahis dès les premières phases de la maladie. La rate (fig. 151), la moelle des os, les glandes lymphatiques des cavités splanchniques, le foie et le testicule sont le plus souvent intéressés. Le poumon, l'intestin et le rein demeurent ordinairement indemnes. Le sang ne paraît contenir le microbe à aucune période de la ma-

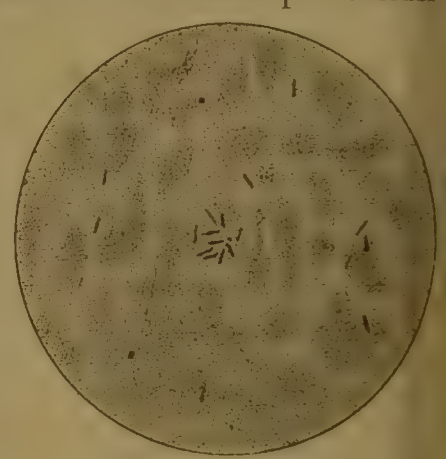


Fig. 151. — Bacille de la lèpre. Rate lépreuse, d'après Besson.

ladie. Les larmes, le mucus nasal, la salive, le renferment dans tous les cas où les muqueuses oculaire, nasale, bucco-pharyngienne sont atteintes. Les liquides pathologiques, exsudés des lépides ulcéreuses et gangreneuses, présentent des bacilles en abondance très variée. Au niveau des téguments malades, on trouve les germes lépreux particulièrement répandus dans le chorion. En dehors des cas d'altération mécanique, l'épiderme proprement dit reste indemne. Ce qui caractérise essentiellement le microbe de Hansen au sein des lésions, c'est son *extrême abondance* habituelle ; c'est aussi son *siège intracellulaire*. Les tubercules sont constitués par de grandes cellules, analogues aux cellules épithélioïdes, ne possédant d'ordinaire qu'un seul noyau, souvent vacuolaires et remplies de bacilles : ce sont les *cellules* dites *lépreuses*. Elles englobent les microbes, grâce à leurs propriétés amiboïdes. Les cellules nerveuses, dans lesquelles on rencontre parfois aussi l'organisme de Hansen, l'ont englobé de même à la faveur des mouvements de leurs prolongements protoplasmiques. Jamais on ne trouve le bacille dans les leucocytes polynucléaires.

Nous devons ajouter que l'agent pathogène favorise la pénétration dans l'organisme d'un grand nombre de bactéries, qui viennent créer des *infections secondaires*. L'association du b. de Koch au b. de Hansen est tout particulièrement fréquente.

II. *Diagnostic bactériologique de la lèpre.*

Les caractères morphologiques du bacille de Hansen et son mode de coloration, ainsi que sa grande abondance habituelle, rendent, dans la majorité des cas, ce diagnostic facile. Souvent, dans la forme tuberculeuse et même maculo-anesthésique, le mucus nasal se montre bacillifère dès la première période et un

simple frottis sur lames peut déceler la nature de l'affection (Sticker, Jeanselme). Cependant M. Sticker a certainement été trop loin en admettant que la lèpre débute presque toujours par une ulcération de la pituitaire, véritable chancre qui persisterait pendant toute la durée de la maladie. Voici, à cet égard, des chiffres rapportés par M. Kolle et concernant une série de cas observés à Robben-Island (colonie du Cap).

Fréquence des bacilles de Hansen dans le mucus nasal.

Sur 30 cas de lèpre mixte. . .	22	fois.
Sur 62 cas de lèpre anesthésique.	21	—
Sur 45 cas de lèpre tuberculeuse.	45	— (et 2 fois dans les crachats.)

M. Kolle a eu aussi l'occasion de faire l'autopsie de deux lépreux, chez lesquels il a trouvé la pituitaire absolument saine. Concluons donc à la fréquence, mais non à la constance des lésions nasales. La recherche du bacille dans la salive, les larmes et les autres sécrétions ou excrétions, donnera quelquefois des résultats positifs. Il est à peine besoin de rappeler que le pus suintant des tubercules ouverts renferme de nombreux bacilles.

La *biopsie* peut devenir indispensable au diagnostic. Cette biopsie portera, suivant les cas, sur un nodule dermique ou sous-dermique, une infiltration développée le long d'un nerf, une masse lépromateuse de la conjonctive, ainsi que l'un de nous en a publié une observation..., etc. Ces différents produits serviront à faire des frottis ou seront débités en coupes.

Le bacille de Koch est la seule bactérie avec laquelle on puisse être exposé à confondre le bacille de Hansen. La grande abondance des germes dans les préparations constituera un fort argument en

faveur de ce dernier. Dans les cas douteux, le criterium de l'inoculation tranchera la difficulté. Enfin, en combinant l'examen microscopique et l'inoculation, on arrivera, plus ou moins aisément selon les cas, à reconnaître l'association des deux microbes dans une même lésion.

BLENNORRHAGIE

Le *gonocoque* est l'agent spécifique des manifestations blennorrhagiques. C'est dire qu'on pourra le rencontrer non seulement dans les urétrites aiguës ou chroniques, mais encore dans toutes les complications de la maladie : cystites, vaginites, abcès péri-urétraux et bartholinites, rectites, métrites, salpingites, péritonites, arthrites, endocardites, pleurésies, iritis, kératites perforantes, abcès pyémiques, etc. On le rencontrera également dans les diverses sortes de conjonctivites blennorrhagiques (conjonctivite classique par auto-inoculation — conjonctivite « leucorrhéique », associée à la vulvo-vaginite des petites filles — conjonctivite des nouveau-nés). Nous devons faire remarquer que, dans la blennorrhagie, un certain nombre de complications peuvent être produites par des microbes associés ; il faudra les distinguer avec soin des manifestations purement gonococciques.

I. *Principaux caractères du gonocoque.*

Caractères morphologiques.

Dans le pus, quelle que soit sa provenance, le gonocoque offre en général un aspect caractéristique. Il est représenté par des microcoques légèrement aplatis ou même réniformes, réunis deux par deux ou quatre par quatre, et formant de riches amas à l'intérieur des leucocytes. Malgré le nombre des organismes inclus, on reconnaît toujours assez bien leur disposi-

tion en diplocoque ou en merista. Les formes diplococciques se retrouvent à état libre entre les cellules, lorsque l'inflammation est récente et intense. On constate, dans les cultures, la même disposition en couples ou en tétrades. Le gonocoque se colore facilement par les différentes couleurs basiques d'aniline ; le bleu de méthylène et la thionine conviennent tout particulièrement. Il se décolore rapidement et complètement par la méthode de Gram ; c'est là un caractère très important, qui permet de le différencier de la plupart des autres cocci ou diplococci. Pour reconnaître la présence du gonocoque dans le pus, on emploie beaucoup aujourd'hui la coloration « vitale » par le *rouge neutre*. Cette matière colorante jouit de la propriété de teinter, dans le pus frais, les seuls gonocoques intracellulaires ; les gonocoques extracellulaires, les microbes associés (intra ou extracellulaires) et les leucocytes sains demeurent incolores. La coloration révèle incontestablement une altération subie par le parasite, sous l'influence des sécrétions leucocytaires ; en effet, lorsque les globules blancs commencent à dégénérer, on les voit prendre peu à peu la matière colorante, tandis que les gonocoques la prennent moins intensivement (Plato). La réaction peut se faire de diverses façons. M. Plato mêle une goutte de pus à une anse de solution de rouge neutre (1 centimètre cube de solution aqueuse saturée à froid, dans 100 centimètres cubes d'eau physiologique) ;. M. Unna laisse sécher sur la lame une solution alcoolique de rouge neutre à 1 pour 100 et étale le pus au-dessus ; certains auteurs emploient une solution colorante acétisée, etc. L'examen se pratique entre lame et lamelle ; la teinte des gonocoques est toujours d'un rouge vif et même foncé ; malheureusement, elle ne tarde pas à disparaître et on ne peut conserver les préparations.

Caractères de culture.

Les cultures ne réussissent que sur gélose-sérum ou en bouillon-sérum. Le sérum humain est de beaucoup celui qui convient le mieux ; on le remplace couramment par du liquide d'ascite. Les autres milieux sont incertains et ne permettent jamais de repiquages. Sur gélose-ascite, on voit apparaître de petites colonies, demi-transparentes, filantes, mucoïdes, finement granuleuses au microscope. En bouillon-ascite, le gonocoque donne un trouble léger ; puis, un voile se forme à la partie supérieure du liquide, pendant que la culture se dépose au fond du tube. MM. Bezançon et Griffon préconisent beaucoup le sang gélosé, sur lequel la vitalité se conserverait pendant 6 mois.

Caractères biologiques.

Le gonocoque est exclusivement aérobie. A la température de l'étuve, il vit au moins quatre semaines (dans les milieux-ascite), mais à la température ordinaire, il meurt rapidement (Morax). Au-dessus de 39°, sa vitalité est vite abolie. Dans le pus, il périt en 72 heures environ.

Caractères d'inoculation.

Inoculé sous la peau de l'homme, le gonocoque détermine une rougeur érythémateuse transitoire, sans phénomènes généraux. Injecté dans l'urètre, il produit une blennorrhagie typique ; l'urètre antérieur se prend d'abord, puis l'infection atteint l'urètre postérieur vers la troisième semaine ; on a remarqué qu'une blennorrhagie chronique n'empêchait pas l'infection expérimentale.

Le gonocoque a été inoculé, par diverses voies et par de nombreux auteurs, à tous les animaux de laboratoire. On n'a obtenu de résultats positifs que par l'injection dans le sac conjonctival des lapins nouveau-nés et, surtout, par l'injection dans le péritoine du cobaye. D'ordinaire, les lésions produites doivent être considérées comme d'ordre purement toxique. En effet, les germes disparaissent au lieu de se multiplier et, d'autre part, avec une dose quelque peu supérieure de microbes tués par la chaleur, on détermine facilement des accidents identiques. Toutefois, on arrive à tuer par infection véritable le jeune cobaye, quand on lui injecte des cultures particulièrement virulentes dans le péritoine (Morax).

II. *Diagnostic bactériologique des affections causées par le gonocoque.*

On peut considérer deux cas, suivant que le gonocoque doit être recherché dans le *pus urétral* ou dans une *complication quelconque* de la blennorrhagie. Dans le premier cas, l'examen microscopique peut suffire à assurer le diagnostic ; dans le second, il est ordinairement nécessaire de recourir aux cultures.

a) *Pus blennorrhagique.* — On évitera de comprimer le pus entre deux lames ou deux lamelles ; on s'expose ainsi à rompre les cellules et à mettre les gonocoques en liberté, c'est-à-dire à leur faire perdre un de leurs meilleurs caractères diagnostiques. Parmi les préparations, les unes seront colorées au bleu de méthylène ou à la thionine ; les autres seront traitées par la méthode de Gram et recolorées par la fuchsine. La méthode au rouge neutre tend à se substituer aujourd'hui à celles qui précèdent.

La recherche du gonocoque, très facile dans la blennorrhagie aiguë, est beaucoup plus délicate lors

d'*écoulements anciens*. De nombreuses préparations seront souvent nécessaires ; M. Neisser conseille même de pratiquer la veille une injection modérément irritante. Il arrive souvent que les organismes trouvés sur les préparations demeurent peu abondants et peu caractéristiques ; il sera alors indiqué formellement de recourir aux cultures. On liquéfiera un tube de gélose et on l'additionnera d'un tiers de liquide d'ascite, ainsi qu'il a été indiqué dans la première partie de cet ouvrage. On coulera le mélange dans une boîte de Pétri et on ensemencera avec une goutte de pus. Les colonies gonococciques se reconnaîtront à leur aspect habituel ; de plus, si l'on porte la boîte de Pétri sous le microscope, on verra qu'à la périphérie de ces colonies les gonocoques n'existent que sur une seule épaisseur, tandis qu'au centre ils forment plusieurs couches (Wertheim). Les colonies suspectes seront prélevées, examinées au microscope et traitées par la méthode de Gram ; on les repiquera ensuite sur gélose-ascite ou en bouillon-ascite. Plus simplement, on fera l'isolement du gonocoque dans des tubes et non dans des boîtes de Pétri ; on doit toujours posséder une provision de tubes de gélose-ascite, milieu indispensable à bien des recherches courantes. A la période tout à fait ultime de la blennorrhagie, il devient souvent fort difficile de recueillir une goutte de pus à l'extrémité du méat. Cependant, il est indispensable de savoir si le gonocoque existe encore dans le canal. On fera uriner le malade au réveil et on prélèvera les filaments de muco-pus qui, après avoir flotté quelque temps, ne tarderont pas à se déposer au fond du verre. Ils seront examinés au microscope et ensemencés. Le centrifugage rendra ici de grands services.

L'examen microscopique permet, dans une certaine mesure, *de déterminer la période à laquelle appartient un écoulement*. Au début, les cellules uré-

trales sont très abondantes, les leucocytes également. Les gonocoques se montrent déjà nombreux et on ne constate la présence d'aucun autre micro-organisme. A la phase d'acmé, les cellules épithéliales deviennent très rares, les leucocytes par contre extrêmement abondants. Les gonocoques, très nombreux eux aussi, sont presque tous situés à l'intérieur des globules blancs. Au déclin, les cellules épithéliales reparaissent et, à côté du gonocoque, on trouve divers autres microbes. Enfin, dans les écoulements invétérés, les cellules épithéliales l'emportent en nombre sur les globules de pus ; les gonocoques ont disparu, mais on rencontre une flore microbienne des plus variées.

b) *Complications.* — Qu'elles se produisent par continuité, le long du tractus génito-urinaire, ou bien à distance, les complications de la blennorrhagie, telles que les montre la clinique, sont loin d'être constamment dues au microbe de Neisser. Pour pouvoir les considérer comme véritablement gonococciques, il faut presque toujours recourir aux cultures. On ensemencera, sur gélose-ascite, les liquides articulaires, le pus des pleurésies ou des péritonites, les sécrétions conjonctivales, etc. Dans quelques cas, les cultures ont pu être complétées elles-mêmes par des examens histologiques ; c'est ainsi que le gonocoque fut retrouvé, par divers auteurs, sur des coupes de végétations endocardiques.

CHANCRE MOU

I. *Principaux caractères du streptobacille du chancre mou.*

Le streptobacille du chancre mou (Ducrey, Unna) est un fin bâtonnet, qui se présente dans le pus sous forme d'individus isolés, de courts chapelets ou de petits amas. Il se teinte assez difficilement par les couleurs basiques d'aniline et ne prend pas le Gram. Traité par la thionine phéniquée, il affecte la forme dite en navette, due à la localisation de la couleur aux deux extrémités. Dans les coupes, ce sont de longues chaînettes, uniformément colorées. Cultivé sur milieux solides, il offre le même aspect que dans le pus ; cultivé en liquide, il forme des chaînettes aussi longues que dans les coupes.

Le bacille pousse sur sang gélosé, ainsi que l'ont montré récemment MM. Bezançon, Griffon et Le Sourd. Au bout de 24 heures, à 37°, on voit apparaître des colonies arrondies, saillantes, brillantes, qui atteignent leur complet développement en 48 heures. Elles deviennent alors opaques, grisâtres et présentent un à deux millimètres de diamètre. Lorsqu'on vient à les prélever, elles ont de la tendance à fuir en masse devant le fil de platine ; elles sont également difficiles à dissocier. Le streptobacille pousse en sérum (non coagulé) de lapin ; le liquide se trouble légèrement et présente de petits flocons. L'ensemencement sur les milieux ordinaires échoue régulièrement.

Le pus du chancre mou est inoculable au singe (Ch. Nicolle) et de singe à singe. On sait depuis longtemps qu'il est indéfiniment inoculable à l'homme.

MM. Bezançon, Griffon et Le Sourd sont arrivés à reproduire chez l'homme un chancre mou type, avec un 11e passage sur sang gélosé.

II. *Diagnostic bactériologique du chancre mou.*

Le diagnostic pourra donc être assuré par l'*examen microscopique*, les *ensemencements* et l'*inoculation*.

1° **Examen microscopique.** — Dans la chancrelle, le bacille de Ducrey-Unna existe toujours en assez grande abondance, mais, comme il se trouve mêlé à de nombreux microbes étrangers, il est parfois difficile à reconnaître. On aura soin d'enlever le pus qui recouvre la surface de l'ulcération, à l'aide d'un jet d'eau stérilisée. On séchera ensuite au papier mousseline, puis, avec un fil de platine terminé en spatule, on grattera légèrement le fond du chancre. La pulpe, ainsi obtenue, sera étalée sur lame et colorée à la thionine. Elle contient des hématies, des leucocytes, des débris épidermiques et des filaments de fibrine ; elle ne renferme pas de fibres élastiques, si on n'a pas gratté trop fortement. Au milieu de tous ces éléments, on trouve divers cocci et bacilles de la peau, le gonocoque de temps à autre, puis le bacille en navette, tantôt isolé, tantôt en chapelets ou en amas, dans les leucocytes ou en dehors d'eux. Quand on peut pratiquer l'ablation du chancre et faire des coupes, on observe des apparences encore plus démonstratives. A la surface de l'ulcération, on ne rencontre que les microcoques et les bacilles de la peau ; mais, dans la profondeur, on trouve les bacilles de Ducrey-Unna disposés en chaînettes parfois fort longues, qui forment, entre les cellules, des traînées tout à fait caractéristiques. Un certain nombre de bacilles sont aussi contenus à l'intérieur des leucocytes, surtout vers la fin de la maladie.

2° **Cultures.** — Les ensemencements se feront su sang gélosé. L'isolement sera d'autant plus facile qu le pus aura été prélevé à une époque plus rapproché du début de l'affection. Il est recommandé d'ense mencer, largement, le pus qu'on aura laissé s'accu muler sous pansement sec, à la surface du chancr préalablement aseptisé. Parfois, l'examen du tube d culture ne révèlera pas encore, au bout de 24 heu res, la présence de colonies caractéristiques et o devra se borner à chercher les chaînettes dans l liquide de condensation. Le lendemain, en tous cas les colonies se manifesteront sur le milieu lui-même

3° **Inoculations.** — On peut pratiquer enfin, soi avec une culture pure, soit avec le pus du chancre des inoculations par scarification sur la peau de singes (semnopithèques ou cercopithèques), ou, plu couramment, sur celle du malade lui-même, suivan la *technique classique*. Un peu de virus est charg sur une lancette et on pique, au niveau du v. deltoï dien, en ayant soin de pénétrer peu profondément Le point piqué est recouvert d'un verre de montre maintenu par une bandelette de diachylon. Lorsqu'i s'agit d'un chancre mou, on constate, dès le lende main ou au plus tard le 2e jour, l'apparition d'un petite pustule, qui laisse bientôt à sa suite une ulcé ration chancrelleuse typique. Dès qu'on a constat les caractères de cette ulcération, on la détruit au thermocautère.

Contrairement à l'opinion de Straus, MM. Bezan çon, Griffon et Le Sourd ont constaté, par la culture, que le contenu des bubons fermés n'est pas toujours stérile. Il n'en reste pas moins vrai que, lorsqu'on s'en tient à l'inoculation, on obtient *régulièrement* des résultats négatifs, ainsi que l'un de nous l'a pu constater bien souvent ; sans doute, dans le pus gan glionnaire, n'existe-t-il que fort peu de germes.

INFLUENZA (BACILLE DE PFEIFFER)

Le bacille de Pfeiffer, regardé comme l'agent pathogène de la grippe, à la suite de l'épidémie de 1891-92, n'est plus considéré comme tel aujourd'hui par la plupart des auteurs. Il peut, en effet, faire défaut dans l'influenza type; M. Pfeiffer lui-même ne l'y a pas retrouvé dans les cas de 1895. Par contre, on l'a isolé dans la coqueluche, dans des bronchites et broncho-pneumonies infantiles (primitives, ou consécutives à d'autres affections, par exemple à la rougeole — Meunier), dans des pneumonies, enfin dans les cavernes tuberculeuses. C'est un hôte normal des voies respiratoires, susceptible de devenir pathogène, comme le pneumocoque, par exemple. Il peut alors se localiser en des points éloignés de l'organisme. Rencontré à plusieurs reprises dans les cellules nerveuses par M. Pfuhl, il a été isolé d'arthrites, de pleurésies, de méningites, d'ostéo-périostites, etc..., le plus souvent grippales.

Le soi-disant bacille de la grippe doit donc être bien connu car, tout en n'ayant rien à voir avec l'influenza, il peut la compliquer, elle et diverses autres affections.

I. *Principaux caractères du bacille de Pfeiffer.*

Caractères morphologiques.

Le b. de Pfeiffer se présente sous forme de petits bâtonnets très fins et très courts, aussi ténus que

ceux de la septicémie des souris et moins longs. Ils forment souvent des chaînettes de 3 à 4 éléments. Ils sont immobiles. Après coloration, ils offrent un aspect pseudo-diplococcique, tenant à ce que les extrémités du bâtonnet fixent plus fortement la couleur. Dans les crachats, ils se montrent toujours très abondants ; ils sont tantôt libres, tantôt intraleucocytaires. Dans les cultures, ils deviennent un peu plus longs et plus épais. Après trois jours, on rencontre des filaments et des formes d'involution très variées. Le bacille de Pfeiffer ne prend pas le Gram et se teinte mal, même par les méthodes directes. M. Pfeiffer recommande de plonger les lamelles, pendant 10 minutes, dans une solution de fuchsine de Ziehl, étendue de 20 fois son volume d'eau distillée. M. Elmassian chauffe à 60°, pour mieux réussir.

Caractères de culture.

Le bacille de Pfeiffer ne pousse que dans les milieux à base de sang ou de sérum. Nous avons déjà indiqué comment MM. Delius et Kolle procédaient pour obtenir la soi-disant toxine grippale. Rappelons qu'ils additionnent le bouillon de sang de pigeon défibriné. On peut recourir aussi au sang humain, au sang de cheval, etc. On peut enfin incorporer ces divers sangs à de la gélose, ou l'en recouvrir. Après ensemencement sur sang gélosé, on voit apparaître, au bout de 20 heures, de petites colonies, visibles à la loupe et ressemblant à des gouttelettes d'eau. Ces colonies atteignent leur maximum de développement en 48 heures. Même à ce moment, il faut examiner attentivement le tube pour bien les apercevoir. Elles meurent déjà en 4 à 5 jours et le repiquage ne peut plus se faire. Sur plaques (de gélose au sang) les colonies apparaissent également très petites ; elles

n'arrivent pas à se réunir, même lorsqu'elles sont très voisines. Le bacille de Pfeiffer se cultive parfaitement sur gélose-ascite (Elmassian, Rosenthal); après 24 heures, on distingue, à la loupe, de fines colonies; après 2 ou 3 jours d'étuve, leurs dimensions peuvent doubler. En bouillon ascite, comme en bouillon au sang, on observe, au bout de 48 heures, un trouble uniforme, qui augmente pendant 3 jours. Le liquide s'éclaircit ensuite.

Le b. de Pfeiffer est très aérobie. Il se développe de 26° à 42° (optimum 37°). Il est très sensible à l'action de la chaleur et de la dessiccation.

Caractères d'inoculation.

Les résultats, fournis par l'inoculation, sont assez variables. M. Pfeiffer, inoculant, avec des cultures pures, des lapins dans les veines et des singes dans la trachée et le poumon, n'a réussi qu'à les intoxiquer. Il n'a observé aucune multiplication des germes introduits. Avec une assez forte dose de cultures sur gélose, M. Kruse aurait donné au lapin des abcès sous-cutanés, dans lesquels les microbes seraient restés parfois vivants pendant plusieurs semaines. MM. Delius et Kolle sont arrivés à infecter, par voie intrapéritonéale, des souris, des lapins et des cobayes. Un cobaye, de 200 à 230 grammes, meurt en 24 heures à la suite de l'inoculation de 1/20 de culture sur gélose ou de $0^{cc},3$ de culture en bouillon. Le péritoine renferme de nombreux microbes vivants; quelquefois même on obtient des cultures avec le sang et les organes. M. Elmassian a constaté que les jeunes cobayes mouraient, en moins d'un jour, à la suite de l'injection intrapéritonéale de 2-4 centimètres cubes de culture de 48 heures en bouillon-ascite. A part la péritonite, il existe fréquemment un exsudat pleural

et péricardique, dans lequel on rencontre des bacilles.

M. Cantani junior a inoculé des lapins dans le cerveau. 1/2 à 1 milligramme de culture sur gélose suffit d'ordinaire pour tuer, en 18 à 36 heures, un lapin de 1 500 à 2 000 grammes. A l'autopsie, les viscères sont congestionnées ; il existe des épanchements dans les séreuses ; les ventricules et les méninges renferment souvent un exsudat purulent ou séro-sanguinolent. On rencontre les bacilles au niveau du point trépané, dans l'encéphale et la moelle, jamais ailleurs. Si la dose injectée est insuffisante, l'animal a d'abord de la fièvre ; puis, au bout de 48 heures, tout rentre habituellement dans l'ordre. Quelquefois cependant, l'inoculation est le point de départ d'une méningite chronique, qui amène la mort de l'animal, au bout d'un temps plus ou moins long. M. Martin, qui inocule le lapin dans le liquide céphalo-rachidien, produit la mort en 2 ou 3 jours. Les microbes se retrouvent dans la sérosité et dans les ventricules. Enfin, en associant le streptocoque au b. de Pfeiffer, plusieurs auteurs ont réussi à obtenir la généralisation exclusive du bacille. Les expériences les plus complètes sont celles de M. Jacobson. Chez le lapin, inoculé dans les veines avec les deux microbes, la mort survient par septicémie pfeifférienne. Chez la souris, inoculée dans le péritoine avec un mélange de streptocoques tués par la chaleur et de b. de Pfeiffer, la mort survient aussi à la suite de la généralisation du bacille. Après 6 passages, ce dernier, injecté seul, suffit à provoquer la septicémie. Mais la virulence, ainsi exaltée, ne tarde point à fléchir.

II. *Recherche du bacille de Pfeiffer.*

Il n'existe presque jamais dans le sang. On le rencontre surtout dans les crachats et, chez les enfants,

dans le mucus pharyngien. La *recherche dans les crachats* est un peu délicate, par suite de l'abondance des microbes étrangers. On suivra le procédé indiqué par M. Kitasato, à propos du bacille tuberculeux. Le malade se gargarisera à plusieurs reprises avec de l'eau stérilisée et on recueillera, dans des verres stérilisés, les crachats expectorés après un accès de toux. On choisira, autant que possible, les parties épaisses et d'un jaune verdâtre, puis, les tenant avec une pince flambée, on les lavera, en les agitant dans plusieurs verres d'eau stérilisée. Après cinq ou six lavages, le crachat est presque complètement débarrassé des impuretés. Il sera alors examiné et ensemencé.

On colorera comme il a été dit plus haut ; on pourra ensuite décolorer légèrement, à l'acide acétique dilué. M. Grassberger préfère la thionine aqueuse (2 pour 100) au liquide de Ziehl. Les microbes sont ordinairement abondants. Extracellulaires pendant la période aiguë, ils diminuent ensuite de nombre et deviennent de plus en plus intracellulaires. En même temps, ils se montrent plus gros, plus irréguliers, plus difficiles à colorer. Ils disparaissent finalement et d'autres organismes (principalement des streptocoques) leur succèdent.

Si on désire obtenir une culture pure du b. de Pfeiffer, on coulera de la gélose liquéfiée dans une boîte de Pétri et, après refroidissement, on déposera à la surface quelques gouttes de sang d'homme, de pigeon, de cheval, etc..., qu'on étalera en couche aussi mince que possible ; on ensemencera ensuite l'émulsion de crachats. On peut aussi faire usage de tubes ou plaques de gélose-ascite.

Certains auteurs ont mis à profit cette remarque de M. Grassberger que le bacille de Pfeiffer se développe aisément, en *symbiose avec le staphylocoque.*

Dans des cas d'infection mixte (b. de Pfeiffer et staphylocoques), M. Grassberger, faisant des plaques d'isolement, a constaté que, loin des amas de staphylocoques, les colonies de b. de Pfeiffer restaient toujours petites, tandis qu'au voisinage elles atteignaient au contraire jusqu'à 1 millimètre de diamètre. En se fondant sur cette observation, M. Meunier conseille le procédé d'isolement suivant : on mélange un volume de sang défibriné de lapin, ou mieux de chat et 3 volumes d'eau stérilisée et on transporte ce mélange à la surface de plusieurs tubes de gélose, à raison de 5-8 gouttes par tube. Les produits suspects sont ensuite ensemencés et les tubes placés à l'étuve, verticalement. Après 4 à 5 heures, on surpique du staphylocoque doré. Au bout de 24 heures, on constate que les colonies de b. de Pfeiffer se sont développées très électivement autour des amas de staphylocoques. On s'assurera que le microbe isolé est bien le bacille de Pfeiffer, en faisant, comparativement, des repiquages sur gélose au sang ou gélose-sérum d'une part et sur gélose ordinaire d'autre part. Cette dernière culture doit rester négative ; le caractère est spécifique.

Les recherches peuvent porter aussi *sur le mucus pharyngien* (c'est le seul moyen de retrouver le microbe chez les enfants), sur *le sang* (pris dans la veine) ou *le suc pulmonaire* (recueilli par ponction aseptique). Dans ces deux derniers cas, la culture seule sera employée, à cause de la rareté des germes. — *Sur le cadavre*, on s'adressera au pus bronchique, aux foyers broncho-pneumoniques, etc.

Les inoculations ne sont susceptibles de rendre aucun service.

M. Pfeiffer a décrit, sous le nom de *pseudo-bacille de l'influenza*, un petit bâtonnet qu'il a isolé des broncho-pneumonies infantiles. Les caractères de

culture sont les mêmes que ceux du « bacille vrai ». Il n'en diffère que par l'absence de propriétés pathogènes pour les animaux et par une taille un peu supérieure. Il semble incontestable que les deux micro-organismes doivent être identifiés. De même pour le bacille d'Elmassian, le cocco-bacille hémophile de Rosenthal et les microbes A et B de Grassberger, que nous avons confondus dans notre description.

MÉNINGITE CÉRÉBRO-SPINALE ÉPIDÉMIQUE

Des microbes très variés ont été rencontrés dans la méningite cérébro-spinale épidémique. C'est ainsi que M. Netter, sur 46 cas, a trouvé :

Le pneumocoque de Talamon-Fränkel. .	11	fois.
Le méningocoque de Weichselbaum. . .	12	—
Le streptocoque de Bonome.	13	—
Le streptocoque pyogène.	7	—
Le staphylocoque doré.	3	—

De son côté, M. Lenhartz, sur 24 cas, a isolé :

Le méningocoque de Weichselbaum. . .	13	fois.
Le pneumocoque de Talamon-Fränkel. .	9	—
Le bacille typhique.	1	—

Par contre, dans une étude très complète, faite à Copenhague pendant l'épidémie de 1898, M. Erik Faber, sur 31 examens bactériologiques (ponction lombaire), a obtenu 27 fois le méningocoque et 4 fois un résultat négatif (quant à cet organisme ou à d'autres). Plus récemment, dans 10 cas de méningite cérébro-spinale, MM. Hunter et Nuttall ont isolé 10 fois le microbe de Weichselbaum.

Nous décrirons successivement les caractères du méningocoque de Weichselbaum (qni semble bien l'agent véritable de la *méningite type*) et ceux du streptocoque de Bonome.

Méningocoque de Weichselbaum.

Dans le liquide céphalo-rachidien, le méningocoque se présente sous l'*aspect* de microcoques isolés

ou réunis, les uns libres, les autres renfermés dans les globules blancs (parfois en très grand nombre). Les individus isolés sont arrondis ; les organismes réunis se groupent par deux ou par quatre, et s'aplatissent sur leurs faces tangentes, comme les gonocoques. Dans les cultures en sérum de lapin, le méningocoque se montre entouré d'une capsule (Griffon). Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et se décolore par la méthode de Gram.

Le microbe cultive assez difficilement, lorsqu'il provient directement de l'organisme ; mais, après plusieurs repiquages, il pousse plus abondamment. Il ne se développe qu'au-dessus de 20° ; l'optimum thermique est de 37°. Sur gélose, la croissance offre son maximum après 48 heures. Il se forme de petites colonies grisâtres, d'abord punctiformes, puis atteignant la dimension d'une graine de pavot. La gélose-ascite sera préférée à la gélose simple, surtout pour les premières cultures. Le sang gélosé convient aussi parfaitement, ainsi que l'ont vu MM. Bezançon et Griffon ; les colonies y sont plates, arrondies ou polycycliques, d'un jaune brunâtre, translucides. Sur sérum d'hydrothorax coagulé, le développement est par contre à peine visible. Dans le bouillon ordinaire, il se produit seulement un léger trouble. Le bouillon-sérum donne le meilleurs résultats. Sur pomme de terre, le microbe croît très mal ; de même dans le lait. La culture est maigre et souvent nulle en gélatine. Dans le sérum liquide de lapin, elle se montre moins riche que celle du pneumocoque. Dans les milieux ordinaires, le méningocoque meurt très rapidement ; on peut le conserver un peu plus longtemps dans les milieux-ascite.

La virulence du microbe de Weichselbaum est généralement très faible et peut même faire défaut. La souris blanche représente l'animal le plus réceptif ; l'inoculation, dans la plèvre ou le péritoine, de 0,5 à

1 centimètre cube d'une émulsion riche de cultures sur gélose, peut tuer, dans l'espace de 36 à 48 heures, avec un épanchement séro-sanguinolent et une hypertrophie de la rate ; les leucocytes de l'exsudat sont remplis de microbes. L'inoculation sous-cutanée reste toujours sans résultat. Chez le cobaye, l'infection intrapleurale détermine parfois la mort. Chez le lapin, l'injection intraveineuse tue dans certains cas, en l'espace d'un à quatre jours ; par contre, l'inoculation sous la dure-mère serait moins dangereuse. Chez le chien, l'infection intrapleurale ne donne que des résultats inconstants, tandis que l'inoculation sous la dure-mère peut faire périr l'animal, en l'espace de 2 à 10 jours, avec méningite. Il en est de même chez la chèvre. Récemment, M. Busquet a réalisé l'infection du cobaye et du lapin par inoculation, sur la pituitaire, de mucus nasal et de liquide céphalo-rachidien humains, provenant de cas types.

Streptocoque de Bonome.

Dans l'exsudat rachidien, le streptocoque de Bonome se présente sous la forme de microcoques tantôt isolés, tantôt réunis par deux, ou sous celle de courtes chaînettes. Les cocci se montrent toujours extracellulaires et se colorent par la méthode de Gram. Ils sont immobiles.

Le bouillon ensemencé apparaît opalescent le premier jour ; le deuxième, quelques flocons grisâtres se réunissent au fond du tube. Sur gélose en strie les colonies sont rondes, miliaires, transparentes, à peine saillantes ; dans la gélose par piqûre, le streptocoque forme une traînée granuleuse. Il ne pousse pas en gélatine. Il ne donne pas de colonies apparentes sur pomme de terre. Le lait peut rester liquide ou se coaguler. Dans le sérum de lapin jeune, on note la pré

sence d'une capsule très nette (Bezançon et Griffon). La vitalité est très marquée dans les différents milieux.

La souris blanche se montre réceptive. L'injection sous-cutanée de cultures ou de produits pathologiques la tue en 48 heures. On observe, au point d'inoculation, un léger œdème, contenant des micrococoques isolés ou en chaînettes, constamment entourés d'une capsule ; le sang et la rate donnent des cultures positives. Chez le lapin, l'inoculation sous-cutanée de pus frais détermine la mort en 3-4 jours, avec exsudat local fibrineux et septicémie ; l'inoculation d'un demi-centimètre cube de culture de 24 heures en bouillon tue en 48 heures. L'injection intrapéritonéale d'exsudat frais fait périr l'animal, avec ou sans épanchement dans la séreuse ; la rate est dure et grosse comme lors de l'infection pneumococcique. L'introduction de cultures sous la dure-mère provoque l'apparition d'une méningite fibrino-hémorragique ; on retrouve, dans l'exsudat, le streptocoque encapsulé. Le cobaye se montre plus résistant à tous les modes d'infection. Le chien est moins sensible encore ; l'inoculation dans le péritoine donne des résultats négatifs ; par contre, l'inoculation sous la dure-mère produit une méningite mortelle.

Tous les auteurs s'accordent pour établir une séparation bien tranchée entre le méningocoque de Weichselbaum et le streptocoque de Bonome, mais les avis sont partagés sur la nature de ce streptocoque. D'après M. Netter ce serait une variété de pneumocoque, atténué dans sa virulence. Pour MM. Bezançon et Griffon au contraire, le streptocoque jouit bien d'une individualité propre, car il pousse agglutiné dans le sérum humain normal, tandis que le pneumocoque ne pousse agglutiné que dans le sérum des sujets infectés par lui.

Diagnostic bactériologigue de la méningite cérébro-spinale.

L'exsudat méningé sera prélevé (sur le vivant, ou de suite après la mort) à l'aide de la *ponction lombaire*. Le liquide obtenu, séreux ou purulent, servira à préparer des lames et à faire des ensemencements. Parmi les lames, les unes seront colorées par le bleu de méthylène ou la thionine, les autres par la méthode de Gram. Le méningocoque se reconnaîtra aisément à ses caractères morphologiques, à son siège souvent intracellulaire et à sa décoloration par le Gram. On l'isolera sur gélose-ascite. Le diagnostic différentiel entre le streptocoque de Bonome, le streptocoque pyogène et le pneumocoque présente un peu plus de difficultés. Le streptocoque de Bonome sera (*d'après les auteurs*) distingué du streptocoque pyogène par ses caractères de culture et la présence d'une capsule dans les organes des animaux infectés. La culture en sérum humain le différenciera du pneumocoque, d'après MM. Bezançon et Griffon.

Quel que soit le microbe isolé, l'inoculation à la souris permettra d'être fixé sur sa virulence.

Nous devons ajouter que la *porte d'entrée* du méningocoque de Weichselbaum et du streptocoque de Bonome paraît être la *muqueuse pituitaire*. Les deux microbes ont été retrouvés en effet dans le mucus nasal, au cours de la méningite cérébro-spinale.

Notons aussi qu'un auteur, qui s'est livré à l'étude du méningocoque, M. Kiefer, a contracté pendant ses recherches une rhinite purulente fétide, non accompagnée d'ailleurs de phénomènes généraux. Au cours de cette affection, il a pu isoler facilement le microbe de Weichselbaum de son mucus nasal.

FIÈVRE DE MALTE

On désigne, sous le nom de fièvre de Malte ou *fièvre méditerranéenne,* une affection longtemps confondue avec la fièvre typhoïde et la fièvre palustre, affection endémique à Malte et sur toute la côte de la Méditerranée. Elle est caractérisée par une durée très longue, de la constipation et des accès fébriles, qui tantôt revêtent le type malarique classique, tantôt restent limités au stade de sueur. Ces phénomènes coïncident avec un état général relativement satisfaisant et avec l'absence de stupeur. Citons encore la fréquence des manifestations articulaires et orchitiques. Le pronostic est habituellement bénin ; la mort ne se produit jamais dans plus de 3 à 5 cas sur 1 000. M. Bruce a montré que l'agent pathogène de cette maladie était représenté par un microcoque, auquel il a donné le nom de micrococcus melitensis.

I. *Principaux caractères du micrococcus melitensis.*

Caractères morphologiques.

Le micrococcus melitensis se présente sous forme de grains arrondis ou ovalaires, le plus souvent isolés, mais quelquefois réunis en diplocoques. Il est immobile. Il se colore facilement par toutes les couleurs basiques d'aniline et se décolore par la méthode de Gram. Pour M. Durham, ce serait en réalité un *cocco-bacille* et des formes allongées s'obtiendraient par culture à la température ordinaire.

Caractères de culture.

Il se développe, quoique faiblement, dans les divers milieux habituels. Ce développement est toujours tardif. En bouillon, on observe un trouble uniforme très léger, qui se manifeste après 2 ou 3 jours. Sur gélose en strie, on voit apparaître, au bout de 3 ou 4 jours, des colonies très petites, de 2 à 3 millimètres de diamètre, comparables à des gouttes de rosée et affectant une grande ressemblance avec celles du pneumocoque. Après quelques jours, elles blanchissent légèrement. Par piqûre, on obtient, le long du trait d'ensemencement, de petites taches d'un blanc de perle. Les cultures en gélatine échouent le plus souvent. Le développement, quand il se fait, reste toujours très faible ; le milieu n'est pas liquéfié. Sur sérum coagulé, de fines colonies, semi-transparentes, apparaissent au bout de deux à trois jours. Elles peuvent atteindre les dimensions d'une petite tête d'épingle, puis elles s'affaissent et se transforment en un léger vernis blanchâtre. La croissance est peu abondante en sérum liquide ; le microbe y forme de fins flocons. Enfin, on n'obtient pas de culture sur pomme de terre.

Caractères biologiques.

La vitalité du coccus melitensis dans les divers milieux est très faible ; elle disparaît en 6 à 8 jours. Il est donc bon de faire des réensemencements tous les 5 jours. Le micrococque se montre strictement aérobie. La température optima est de 37°. Enfin, le coccus se laisse agglutiner par le sérum des personnes atteintes de fièvre méditerranéenne ; le sérum des typhiques et des paludéens demeure par contre

sans effet sur lui (Wright et Smith). Disons de suite que, d'après MM. Birt et Lamb, on obtient un sérum agglutinant, en injectant le microbe au singe, au cobaye et au lapin ; chez le singe inoculé, le pouvoir agglomérant apparaît dès le 5e jour.

Caractères d'inoculation.

Les essais, tentés sur les divers animaux de laboratoire, ont échoué entre les mains des auteurs. Seul, M. Durham est parvenu à tuer le cobaye et le lapin par inoculation intracérébrale et à obtenir ainsi un renforcement notable de la virulence. Le microbe renforcé peut faire périr le cobaye (à la longue) par injection intrapéritonéale.

Le singe se montre très réceptif ; l'inoculation sous-cutanée lui donne une affection fébrile, comparable à celle de l'homme. La température présente les mêmes grandes oscillations. La maladie peut se prolonger pendant des mois et aboutir à la guérison, mais il arrive aussi que la mort survienne vers le 2e septénaire, alors qu'elle est tout à fait exceptionnelle chez l'homme à une époque aussi prématurée.

II. *Diagnostic bactériologique de la fièvre de Malte.*

Sur les rives de la Méditerranée, on devra songer à la maladie de Bruce chaque fois qu'au cours d'une fièvre continue ou intermittente le sérodiagnostic pratiqué avec le bacille d'Eberth et la recherche de l'hématozoaire auront fourni un résultat négatif. Le coccus melitensis ne passe jamais dans le sang, mais il se rencontre dans la rate. *On pourra donc l'isoler in vivo* de cet organe. La lenteur de son développement et la croissance très maigre dans les divers milieux

de culture permettront de le reconnaître facilement. Toutefois, pour la fièvre de Malte comme pour la fièvre typhoïde, la ponction de la rate doit désormais céder le pas au *sérodiagnostic*. L'agglutination du coccus melitensis, sous l'influence du sérum des malades, se montre fort nette, mais toujours à un taux moins élevé que cela n'a lieu dans l'agglutination typhique ; ce taux dépasse rarement 1/20 à 1/30, le plus souvent il est compris entre 1/10 et 1/15. L'un de nous s'est assuré que le sérum des individus sains, des paludiques ou des malades atteints de dothiénentérie n'exerçait sur le coccus melitensis aucune action agglomérante. On pratiquera le sérodiagnostic soit à l'aide de l'examen miscroscopique, soit à l'aide de la culture ; la technique est identique à celle décrite pour la fièvre typhoïde. Ajoutons que, d'après M. Durham, on pourrait isoler le microcoque de l'urine *in vivo* ; c'est là une donnée très importante à connaître.

A l'autopsie, l'attention sera attirée sur la possibilité d'une fièvre de Malte par l'absence des lésions propres au paludisme et à la dothiénentérie. On fera des cultures avec les pulpes splénique et hépatique. On pourra aussi pratiquer des ensemencements avec la substance rénale, dans laquelle le microcoque a été rencontré fréquemment. L'épreuve du sérodiagnostic sera faite, si l'on veut, avec le sang du cœur. Il est inutile d'ensemencer celui-ci, car le microbe ne passe pas dans le système circulatoire, même après la mort.

Nous devons rappeler ici que MM. Birt et Lamb ont observé 3 cas d'*infection de laboratoire*, avec sérodiagnostic positif. On ne saurait donc être trop prudent dans les recherches, car une simple piqûre virulente donne vraisemblablement à coup sûr la maladie.

M. Wright a préparé un *sérum actif contre la fièvre de Malte*, mais ses recherches n'ont pas encore été publiées en détail.

CONJONCTIVITE DIPLO-BACILLAIRE CHRONIQUE

La conjonctivite diplo-bacillaire chronique, décrite au point de vue clinique et bactériologique par M. Morax, puis par M. Axenfeld, est une affection fréquente, mais si bénigne que, le plus souvent, les malades ne viennent pas consulter l'oculiste. Elle débute par une agglutination des paupières ; elle s'attaque à un œil, puis passe rapidement à l'autre. La sécrétion purulente est toujours peu abondante et les signes fonctionnels médiocrement accusés. La durée varie entre 2 semaines et 6 mois.

Dans l'exsudat, recueilli de préférence au niveau des caroncules, on rencontre, ainsi que l'a indiqué M. Morax, un *diplo-bacille* assez volumineux, à extrémités arrondies (fig. 152). Il peut se présenter sous forme de chaînettes ou d'amas. Il est généralement libre, mais quelquefois cependant situé à l'intérieur des leucocytes. Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram. Dans les cultures, l'aspect est très analogue ; ce sont des diplo-

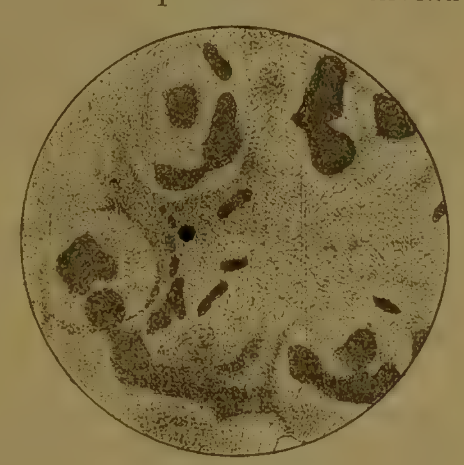


Fig. 152. — Diplo-bacille de Morax dans l'exsudat conjonctival.

bacilles ou des chaînettes, toujours immobiles (fig. 153). Après 4-5 jours, on voit apparaître des formes d'involution volumineuses, plus ou moins irrégulières.



Fig. 153. — Diplobacille de Morax. Culture en bouillon-ascite de 24 heures.

L'agent de la conjonctivite chronique ne se cultive que dans les milieux à base de sang ou de sérum. Ensemencé sur gélose-ascite à 37°, il forme, en 24 heures, de petites colonies grises ; ces colonies atteignent 2 à 3 millimètres de diamètre après 5-6 jours. Dans le bouillon-ascite, il se produit, en 24 heures, un trouble uniforme, moiré par agitation ; au bout de 8 à 10 jours, le bouillon se clarifie et un dépôt apparaît au fond du tube ; la réaction du milieu n'est pas modifiée. En liquide d'ascite pur, le développement reste peu abondant. Le sérum coagulé convient mieux ; on le voit se liquéfier lentement.

Le diplobacille de Morax est un aérobie strict. Il se conserve longtemps à 37°, mais meurt au bout de 48 heures à la température ordinaire. Enfin, il est tué en 15 minutes à 58°.

Inoculé sur la conjonctive de l'homme (Morax, Axenfeld), il reproduit la maladie. Les essais d'infection chez les divers animaux, y compris le singe, ont toujours échoué.

L'examen microscopique suffit à assurer le *diagnostic*. Si l'on désirait obtenir le microbe en culture pure, on ferait, avec le pus, des séparations sur gélose-ascite.

CONJONCTIVITE AIGUË CONTAGIEUSE

Affection due au *bacille de Weeks-Morax,* dont la recherche est indispensable pour le diagnostic et, partant, pour le pronostic, car la maladie, qui pourrait inquiéter tout d'abord, se termine toujours par la guérison. L'examen bactériologique est également important au point de vue prophylactique, car la conjonctivite, très contagieuse, se propage rapidement à une famille, une école, un quartier.

Le bacille de Weeks-Morax se montre plus ou moins abondant dans l'exsudat conjonctival, où il existe presque à l'état de culture pure (fig. 154). Il offre la forme d'un petit bâtonnet court et immobile. Il est très fin, rectiligne, isolé ou réuni en chaînettes de 2 ou 3 articles. Les parasites siègent entre les leucocytes ou dans leur protoplasma, qui peut en contenir un grand nombre. Le maximum d'abondance se manifeste le troisième ou le quatrième jour. Les bacilles se colorent par toutes les couleurs basiques d'aniline, mais se décolorent par la méthode de Gram. Dans les cultures, ils prennent souvent une forme

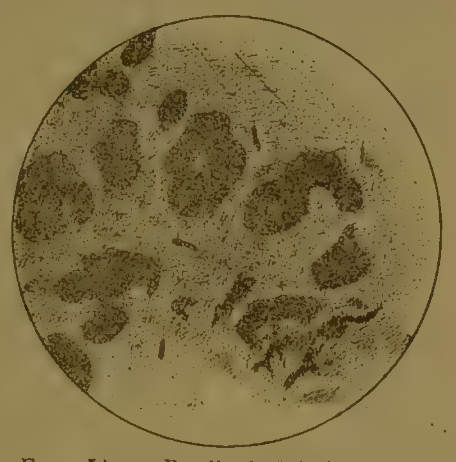


Fig. 154. — Bacille de Weeks-Morax dans l'exsudat conjonctival.

allongée; après 8 jours ils se teintent déjà difficilement; plus tard, il devient impossible de les colorer.

M. Weeks n'a pas réussi à isoler le micro-organisme en cultures pures; M. Morax a été plus heureux. Le microbe se développe sur la gélose en formant de petites colonies microscopiques. La culture en bouillon ne s'obtient qu'exceptionnellement. Enfin, il ne se développe pas en gélatine. Dans ces derniers temps, M. Morax a constaté que l'on pouvait obtenir aisément des cultures et même des cultures relativement abondantes, quand on emploie les milieux-sérum.

Le bacille de Weeks-Morax ne pousse qu'à la température de l'étuve. Sa vitalité est faible et il est assez difficile à entretenir. Il est nécessaire de le repiquer tous les 2 ou 3 jours sur la gélose ordinaire, à intervalles un peu plus éloignés sur les milieux-sérum.

Les inoculations fournissent, chez tous les animaux et même chez le singe, des résultats négatifs. Elles réussissent au contraire à coup sûr chez l'homme (Weeks, Morax, Hoffmann).

POURRITURE D'HOPITAL

On sait que la pourriture d'hôpital est caractérisée par le *ramollissement putride des plaies, qu'envahit un exsudat* fétide, épais, pseudo-membraneux. Ainsi que l'a fait voir M. Vincent, si on colore, à l'aide d'une couleur basique d'aniline, des frottis de cette couenne putride, on rencontre en quantité ordinairement très grande, parfois à l'état de véritable culture pure, un *bacille particulier*, tantôt rectiligne, tantôt légèrement incurvé, quelquefois filamenteux ou en S allongé (fig. 155). L'aspect rappelle un peu celui du vibrion septique; toutefois les extrémités du bâtonnet se montrent amincies, ce qui lui donne une *apparence fusiforme caractéristique*. Beaucoup de bacilles sont en voie de segmentation ou articulés deux par deux. Dans les préparations teintées au bleu de méthylène, le corps microbien prend d'ordinaire la matière colorante de façon inégale et paraît discontinu. Le nombre des parasites, toujours très grand, se trouve en rapport avec la gravité du cas.

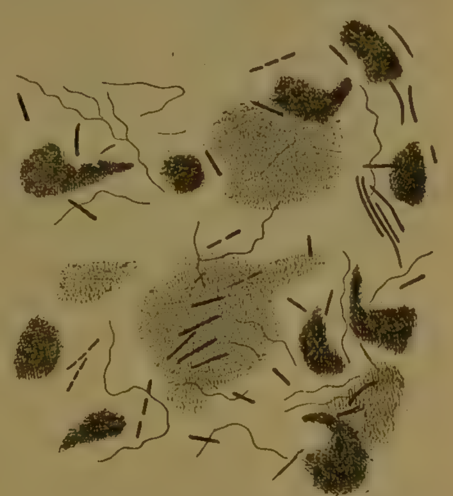


Fig. 155. — Pourriture d'hôpital (frottis de l'exsudat pulpeux).

L'organisme est immobile. Il se décolore par la méthode de Gram. Il est ordinairement associé, dans les lésions, à un *spirille* très fin, difficile à colorer, ne prenant pas le Gram et impossible à cultiver. La pulpe sphacélée peut en renfermer des quantités considérables; il est même parfois plus abondant que le bacille fusiforme. L'association d'autres organismes est beaucoup plus rare. Le microbe de la pourriture d'hôpital ne se généralise pas ; on ne le retrouve même pas dans les ganglions dont dépend la région intéressée.

Tous les *essais de culture* soit au contact, soit à l'abri de l'air, ont échoué. Il en a été de même des *tentatives d'inoculation* à l'aide des procédés courants. M. Vincent a obtenu quelques résultats positifs en s'adressant à des lapins tuberculeux ou inanitiés et en leur injectant, sous la peau, un mélange de pulpe et de microbes divers. Le meilleur moyen consiste à faire jeûner l'animal pendant 3 jours et à inoculer, en même temps, de la pulpe, du colibacille et du staphylocoque. M. Coyon a réussi de son côté, en dilacérant les muscles de la cuisse d'un cobaye et en déposant, au fond de la plaie anfractueuse ainsi produite, quelques fragments de couenne et un centimètre cube de sanie. La plaie fut fermée par un point de suture et collodionnée. 18 jours plus tard, elle présentait tous les caractères de la pourriture d'hôpital. Il a été toutefois impossible de faire des passages. Le bacille de Vincent ne paraît pas inoculable à l'homme, tout au moins en dehors des circonstances spéciales, qui permettent de réaliser la lésion chez l'animal.

En présence d'un cas suspect, on fera des frottis avec la couenne et la sanie et on recherchera avec soin le bacille fusiforme, dont l'abondance constitue un élément de *pronostic* important.

Sur le cadavre, on pourra enlever un fragment de la plaie, et le débiter en *coupes*. M. Vincent conseille de colorer pendant 10 minutes à froid, par la thionine phéniquée et de traiter ensuite pendant quelques secondes par l'alcool faiblement iodé, puis par l'alcool absolu, additionné de safranine. Au microscope, l'aspect est très caractéristique. On voit, à un faible grossissement, deux zones distinctes (fig. 156). L'une superficielle, constituée par l'exsudat diphtéroïde, se montre remarquablement pauvre en éléments cellulaires ; dans sa portion profonde, où se trouve la couche active de prolification du parasite, elle prend une coloration d'un bleu intense. La



Fig. 156. — Pourriture d'hôpital. Coupe d'un tison envahi, vu à un faible grossissement.

zone sous-jacente est formée par les tissus mortifiés, très altérés à la suite de l'évolution du bacille. Au-dessous du district microbien et à son voisinage immédiat, existe une agglomération abondante de leucocytes. A un grossissement plus fort, on retrouve, dans la couche membraneuse, l'agent de la pourriture d'hôpital. Allongé et filamenteux à la surface de l'exsudat, où il est plus clairsemé il devient un peu plus court dans la profondeur, où il est aggloméré en faisceaux très denses. A côté des bacilles, on rencontre souvent les spirilles dont nous avons parlé.

ANGINE DE VINCENT

Le « bacille fusiforme » est l'agent pathogène d'une variété d'angine, très spéciale au point de vue clinique, comme au point du vue bactériologique, et séparée par M. Vincent du groupe des angines à fausses membranes. La maladie revêt deux formes principales : l'une *diphtéroïde,* causée par le seul bacille fusiforme, l'autre *ulcéro-membraneuse*, due à l'association du bacille de Vincent et d'un spirille.

I. *Principaux caractères du bacille fusiforme.*

Caractères morphologiques.

Il se présente sous l'aspect d'un bâtonnet renflé à son centre et terminé en pointe à ses extrémités, d'où son nom. Ses dimensions sont assez variables ; il se montre parfois très long et peut même devenir filamenteux. On le voit tantôt rectiligne, tantôt infléchi en virgule, principalement dans les formes jeunes et courtes. On constate assez souvent, dans le corps bacillaire, des vacuoles incolores, inégales entre elles. au nombre de 1 à 4, ou davantage, suivant la longueur du micro-organisme. Ces vacuoles ne sont bien apparentes que dans les préparations traitées par un colorant peu énergique. Il existe diverses formes d'involution, dans lesquelles le bacille affecte des proportions gigantesques, montre des granulations, se colore mal, etc. D'après M. Letulle, le microbe de

Vincent serait mobile, quand on l'examine dans la salive même du sujet ; il serait immobile dans toutes les autres circonstances. Cette opinion a été contestée par plusieurs auteurs. Le b. fusiforme se colore bien par les couleurs basiques d'aniline ; les réactifs de choix sont la thionine phéniquée et le liquide de Ziehl dilué. Il ne se teinte pas par la méthode de Gram.

Essais de culture et d'inoculation.

La culture à l'état pur n'a pas été réalisée jusqu'ici. Mais, si l'on ensemence une parcelle de l'exsudat amygdalien dans du bouillon peptonisé, on obtient une *culture impure,* dans laquelle le bacille s'est un peu multiplié. Il se multiplie mieux encore dans les milieux organiques liquides (sérum sanguin, sérosité céphalo-rachidienne additionnée de sang, liquide d'épanchement pleurétique..., etc), surtout si ces milieux proviennent de l'homme (Vincent). MM. Niclot et Marotte sont parvenus à faire trois repiquages successifs dans un mélange d'une partie de bouillon et de trois parties de sérum humain. Les cultures impures, ainsi obtenues, dégagent une odeur fétide, rappelant absolument celle du pharynx des malades atteints de l'angine de Vincent.

L'*inoculation* des fausses membranes ou des cultures précédentes, sous la peau ou dans les muscles du cobaye ou du lapin, donne lieu à des abcès, à des trajets fistuleux, à des foyers de nécrose ulcéreuse, où l'on retrouve, au milieu de nombreuses bactéries étrangères, le bacille fusiforme, parfois très abondant. La contusion préalable des tissus et l'injection d'acide lactique au 1/5 favorisent la production de ces lésions et la multiplication de l'organisme pathogène (Vincent).

II. *Diagnostic bactériologique de l'angine de Vincent.*

En présence des résultats incomplets fournis par les cultures et les inoculations, le diagnostic sera basé uniquement sur l'examen microscopique ; celui-ci ne peut d'ailleurs donner lieu à aucune erreur. Des frottis, faits avec la fausse membrane ou le produit de raclage de l'ulcération, seront colorés par la thionine phéniquée (il est indiqué d'employer parallèlement la méthode de Gram, comme contrôle). Dans la *forme pseudo-membraneuse,* on trouvera, en quantité parfois colossale, les bacilles caractéristiques, tantôt dispersés en semis uniforme dans le champ de la préparation, tantôt rassemblés sous forme d'amas irréguliers, parfois même de faisceaux d'éléments divergents, presque radiés. Ils présentent leur maximum d'abondance dans les premiers jours de la maladie ; un peu plus tard, les bactéries de la bouche envahissent à leur tour la fausse membrane. Dans la *forme ulcéro-membraneuse*, la plus fréquente, l'examen bactériologique montre le bacille de Vincent associé à un *spirille,* que l'on peut trouver en proportion parfois très élevée (fig. 157). Ce spirille est fort ténu ; il se colore moins bien que le b.



Fig. 157. — Frottis de fausses membranes B. fusiformes avec association spirillaire.

fusiforme ; il ne prend pas le Gram. Le nombre des individus est très variable. Ils sont plus abondants à la surface de la fausse membrane que dans sa profondeur. Ils se montrent très mobiles. Enfin, ils ne peuvent être ni cultivés ni inoculés.

Dans la forme diphtéroïde de l'affection, l'examen microscopique des frottis pourra être complété par celui des *coupes*. L'aspect est tout à fait caractéristique (fig. 158). Après coloration par la thionine phéniquée (15 minutes), passage, pendant quelques secondes, dans la glycérine acétique à 1/200, lavage à l'eau, déshydratation et montage dans le baume (Vincent), on reconnaît trois zones distinctes. Dans la plus superficielle, les bacilles sont répartis d'une manière assez inégale, mélangés à un grand nombre de microbes étrangers, en particulier à des cocci. Dans le district sous-jacent, ils forment un feutrage tellement dense qu'il est impossible de les discerner isolément. Ils sont moins nombreux dans la couche la

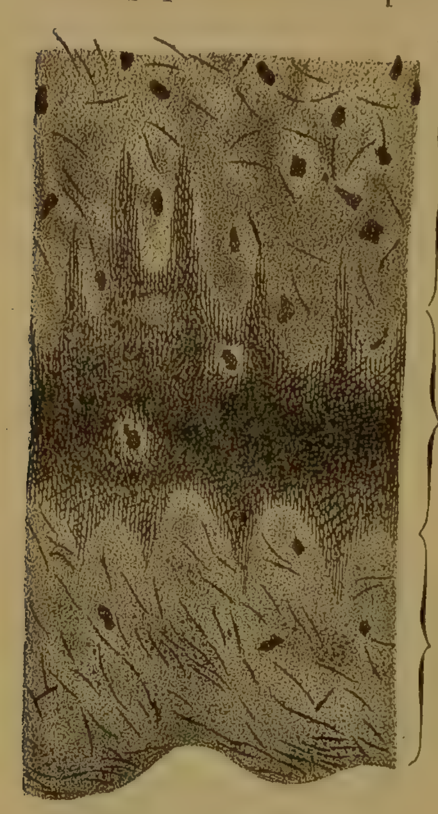


Fig. 158. — Coupe de fausses membranes à bacilles fusiformes.

plus profonde, où ils se montrent à l'état complètement pur.

L'association du bacille fusiforme et du spirille a été notée également dans la *stomatite ulcéro-membraneuse* (Bernheim et Popischill, Abel) et dans certains abcès buccaux. Ces deux micro-organismes représentent des hôtes vulgaires de la bouche, où ils se rencontrent communément dans le tartre dentaire. Ils sont susceptibles de végéter faiblement à la surface des ulcérations syphilitiques et des fausses membranes déterminées par d'autres bactéries. Toutefois, ils se montrent trop peu nombreux, dans ces conditions, pour pouvoir induire en erreur. Leur véritable rôle pathogène ne s'affirme donc que dans l'angine de Vincent et la stomatite ulcéro-membraneuse. Nous ferons remarquer, en terminant, l'analogie qui existe entre la bactériologie de l'angine de Vincent et celle de la pourriture d'hôpital. On trouve, dans les deux cas, un bacille de mêmes dimensions, de forme analogue, très fréquemment associé à un fin spirille. Le parallèle se poursuit jusque dans les effets de l'inoculation (Vincent).

FIÈVRE JAUNE

I. *Principaux caractères du bacille ictéroïde.*

Caractères morphologiques.

Le microbe trouvé par M. Sanarelli dans la fièvre jaune et auquel il a donné le nom de bacille ictéroïde (ou encore de b. amaril), se présente sous l'aspect d'un bâtonnet à bouts arrondis, en général deux fois plus long que large (fig. 159). Cette forme varie du reste beaucoup avec le milieu nutritif, l'âge de la cul-

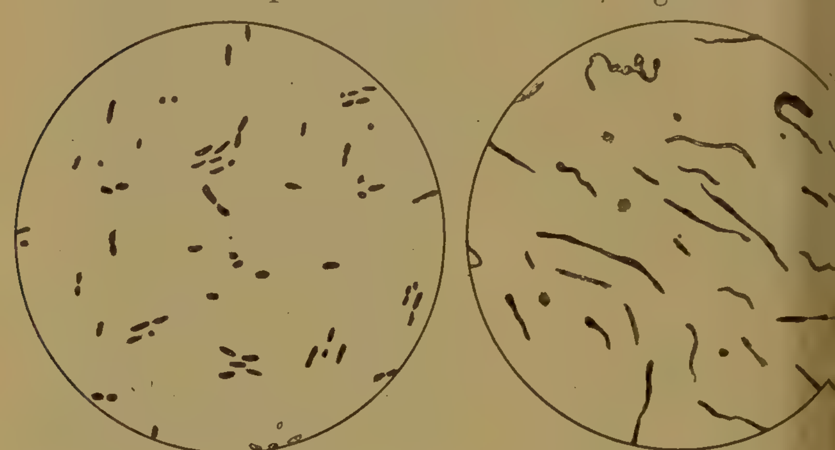


Fig. 159. — Bacille ictéroïde.

Fig. 160. — Bacille ictéroïde. Fo[rmes] d'involution.

ture, etc. Les types d'involution se montrent très fréquents (fig. 160). Le bacille ictéroïde est mobile; cette mobilité reconnaît pour cause la présence de cils vibratiles longs et nombreux (4 à 8). Il se teinte facilement avec les colorants ordinaires, mais ne résiste pas à la méthode de Gram.

Le microbe de Sanarelli a été retrouvé à la Nouvelle-Orléans par MM. Pothier et Hamilton Jones; dans le Mississipi, la Louisiane et l'île de Cuba par par M. Geddings; à San Paulo par M. Mendoza, à Rio par M. Ramos, à Mexico par MM. Gutherer et Pieto, enfin à Marseille, chez un malade venant du Brésil, par M. Gauthier, dont l'un de nous a pu étudier les cultures. Nous devons dire toutefois que *sa valeur étiologique est très fortement suspectée à l'heure actuelle*.

Caractères de culture.

Le bacille ictéroïde, provenant directement du cadavre, pousse assez mal en bouillon. Lorsqu'il s'est habitué à vivre dans les milieux nutritifs artificiels, la culture s'obtient au contraire régulièrement et se traduit par un aspect trouble, sans pellicule superficielle ni dépôt floconneux. La croissance reste toujours assez précaire, même en bouillon Martin et en bouillon-sérum. Le meilleur milieu liquide serait constitué par un mélange (*ââ*) de bouillon sans peptone et de sang de chien ou de lapin (Bruschettini). Le bouillon, additionné de 2 pour 100 de lactose et de carbonate de chaux, constitue aussi un bon milieu, d'après M. Sanarelli.

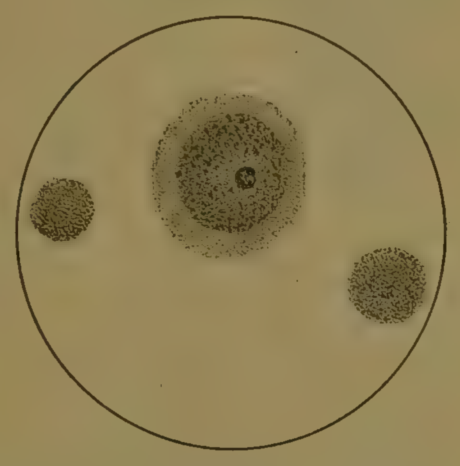


Fig. 161. — Bacille ictéroïde, isolé de l'organisme, en plaques de gélatine.

Sur plaques de gélatine à 22° (fig. 161), les colonies se présentent

tout d'abord sous forme de petits points arrondis, transparents, incolores. Lorsqu'elles sont rapprochées, elles cessent bientôt de croître, deviennent opaques et finissent par se transformer en autant de taches foncées. Si, au contraire, elles sont éloignées les unes des autres, elles continuent à augmenter de volume ; puis un noyau apparaît, plus ou moins sombre, plus ou moins développé, mais toujours entouré d'un halo clair, d'où partent de fines granulations irradiées vers la périphérie. La culture par piqûre n'a rien de caractéristique ; en strie, on observe de petites perles, d'aspect blanc laiteux, qui peuvent rester stationnaires ou continuer à se développer, en coulant vers les parties déclives et en donnant lieu à des petites gouttes brillantes et cireuses (fig. 162).


Fig. 162. — Bacille ictéroïde. Culture en strie sur gélatine.

Si on ensemence en strie, sur gélose, un produit contenant peu de germes, de façon à avoir des colonies espacées et qu'après 24 heures de séjour à 37° on transporte les cultures à la température de 20° à 28°, on voit apparaître, tout autour des colonies, un bourrelet qui représente une seconde phase du développement. L'aspect qui en résulte a été comparé à celui d'un sceau de cire à cacheter. Il offre une grande importance pour le diagnostic ; toutefois, on ne l'observe que si le microbe provient directement de l'homme ou du chien (Bruschettini).

Le sérum coagulé se montre peu propice à la croissance du b. amaril ; on observe une couche luisante,

très transparente et à peine visible. Sur pomme de terre, c'est également une fine pellicule, glacée, difficilement perceptible. Enfin, le bacille ictéroïde se développe dans le lait qu'il ne coagule pas.

Caractères biologiques.

Le microbe de Sanarelli est un anaérobie facultatif. Il produit peu d'indol. Il fait fermenter activement le glucose, plus faiblement le saccharose. La température de 60° le tue en quelques instants et celle de 65° immédiatement. Il est très résistant à la dessiccation. Enfin, il sécrète une toxine qui, injectée dans les veines du chien, lui donnerait une affection identique à la fièvre jaune humaine. A l'autopsie, on trouve une gastro-entérite hémorragique, de la néphrite et de la stéatose du foie.

Caractères d'inoculation.

Le bacille amaril se montre pathogène pour la plupart des animaux. Quelques gouttes de culture, injectées sous la peau de la souris, la tuent en 3 à 5 jours. A l'autopsie, le foie présente des taches blanchâtres, la rate est tuméfiée et hémorragique ; les reins sont atteints de glomérulo-néphrite. Il existe de nombreux microbes dans le sang et les organes, particulièrement dans la rate. Chez le cobaye, l'infection peut s'obtenir indifféremment par les diverses voies. A la suite de l'inoculation sous-cutanée, la mort survient le plus souvent entre le 5e et le 8e jour. A l'autopsie, la rate atteint 4 à 5 fois le volume normal ; le rein est d'ordinaire très altéré, le sang et les viscères présentent de nombreux microbes. Le lapin est tué régulièrement en 48 heures par injection intraveineuse ; à la suite de l'inoculation sous-cutanée, la mort survient

d'ordinaire en 4 à 5 jours. A l'autopsie, les lésions et la répartition du microbe sont très analogues à ce qu'on observe chez le cobaye.

Le chien se montre également réceptif. L'emploi de cet animal permettrait de démontrer l'identité de la fièvre jaune expérimentale et de la fièvre jaune humaine. Le chien est toutefois moins sensible que les rongeurs précédents. Le singe ne succombe pas toujours à l'inoculation sous-cutanée.

II. *Diagnostic bactériologique de la fièvre jaune.*

L'isolement du bacille ictéroïde offre, dans la plupart des cas, de *grandes difficultés*, dues en partie à la présence d'infections secondaires (colibacille, streptocoque, staphylocoque), en partie à la rareté numérique de l'agent pathogène. Au début de la maladie, le microbe de Sanarelli se rencontre en très faible quantité et ce n'est qu'à la fin qu'il se développe franchement et peut envahir l'organisme tout entier. On pourra alors l'extraire soit de la rate, soit du sang. Les ensemencements seront pratiqués sur des tubes de gélose inclinée. Dans les cas heureux, on obtiendra, si l'on suit la technique indiquée, les colonies en cachet de cire caractéristiques. Lorsque d'autres microbes viennent associer leur action à celle du b. amaril, ce dernier devient d'autant plus difficile à isoler que certains de ces microbes paraissent empêcher son développement. Sur le *cadavre,* on fera des ensemencements avec le sang du cœur, les pulpes hépatique et splénique et la substance rénale. Le microbe de Sanarelli n'étant pas abondant au sein des organes, sa recherche dans des *coupes,* à l'aide des procédés habituels, risquerait fort de demeurer infructueuse. Mais si l'on place, pendant 12 heures,

à 37°, des fragments de foie (fig. 163), de rate ou de reins, lavés extérieurement au sublimé et suspendus dans un flacon fermé, on favorise artificiellement la multiplication des bacilles qui pourront alors être recherchés avec succès, en employant la coloration directe. On les voit former des amas dans les capillaires

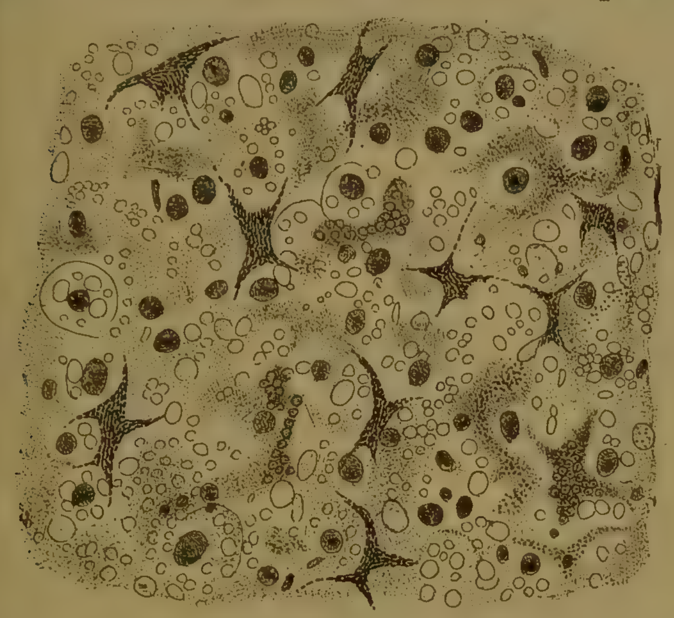


Fig. 163. — Amas de bacilles ictéroïdes dans le foie, mis à l'étuve.

des divers organes, particulièrement au niveau de leurs sinuosités et de leurs bifurcations.

Mentionnons, en terminant, que d'après MM. Archinard et Woodson, le sérum des malades atteints de fièvre jaune agglutine le b. ictéroïde. Toutefois, cette épreuve n'aurait de valeur que si le sérum agglomère au 40ᵉ.

III. *Sérothérapie de la fièvre jaune.*

En injectant, dans les veines du cheval, des cul-

tures filtrées, puis des cultures stérilisées et enfin des cultures vivantes, M. Sanarelli a obtenu un sérum qui protège le cobaye (24 heures avant l'inoculation), à la dose de $0^{cc},5$ et le guérit (48 heures après l'infection), à la dose de 2 centimètres cubes. L'immunisation du cheval, très délicate, demande 12 à 14 mois. Le sérum obtenu aurait donné de bons résultats prophylactiques et thérapeutiques à Rio et à San Carlos.

FIÈVRE RÉCURRENTE

On sait que la fièvre récurrente, inconnue en France, s'observe souvent en Russie et parfois dans l'Allemagne du Nord, la Bosnie et l'Herzégovine, l'Irlande, etc. Elle est caractérisée par des accès fébriles à début brusque, durant de 4 à 8 jours, suivis d'une crise, et se répétant 3, 4 ou même 5 fois, après des intervalles d'apyrexie de quelques jours. La guérison est la règle.

Cette affection est due à un *spirille*, découvert par Obermeïer dès 1868. Il apparaît dans le sang quelques heures avant l'accès et disparaît aussitôt après. Pendant l'apyrexie, il ne se rencontre que dans la rate.

I. *Principaux caractères du spirille d'Obermeïer.*

Le spirille est facile à voir, sans coloration, dans le sang frais, où il se montre ordinairement fort abondant. Constitué par de longs filaments onduleux, dont la spire compte de 5 à 20 tours, il jouit de mouvements très vifs. La mobilité est due à la présence de 4 cils vibratiles, deux à chaque extrémité (Karlinski). En s'agitant, le spirille déplace violemment les hématies qu'il rencontre sur son passage. Le microbe d'Obermeïer ne forme pas de spores. Il se teinte assez difficilement ; on se sert habituellement du violet de gentiane et on prolonge la coloration ; mais les hématies se teintent, elles aussi, et

l'examen de la préparation devient malaisé. Afin de dissoudre l'hémoglobine, on aura avantageusement recours au procédé de Günther. La lame de sang, fixée par la chaleur, est traitée par une solution d'acide acétique à 5 pour 100, pendant dix secondes; on sèche rapidement, puis on expose, quelques secondes, aux vapeurs d'AzH^3; on teinte avec le violet de gentiane aqueux et on lave. Les globules rouges restent incolores; seuls, les spirilles et les globules blancs prennent le violet. Le spirille d'Obermeïer ne résiste pas au Gram.

Les *essais de culture* ont constamment échoué. Toutefois, le spirille peut se conserver vivant pendant 100 jours dans le corps de la sangsue. En goutte pendante à 36°,5, il vit de 18 à 48 heures dans le sang d'homme et de 23 à 57 heures dans le sang de singe (infectés). En goutte pendante, à 16°-20°, il est susceptible de vivre 2 à 3 jours dans les deux sortes de sangs.

L'*inoculation* aux animaux usuels de laboratoire demeure toujours sans résultat. Chez l'homme, par contre, elle réussit constamment (Münch, Moczutkowsky, Metchnikoff..., etc.). Ainsi que l'ont montré MM. Carter et Koch, l'injection du sang des malades, sous la peau des singes du Vieux Continent, reproduit parfaitement l'affection. Après une incubation de 2 à 6 jours, un accès caractéristique se

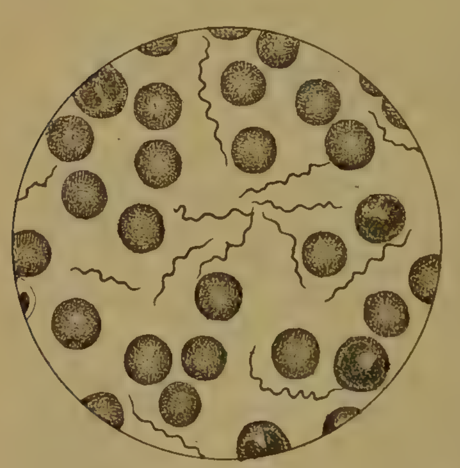


Fig. 164. — Spirilles d'Obermeïer, dans le sang du singe dératé.

manifeste, qui dure 2 à 4 jours. On constate alors, dans le sang, la présence du spirille caractéristique. On n'observe jamais de rechutes. L'inoculation, après injection intraveineuse de suie ou de carmin, détermine une affection longue et grave. Enfin, l'inoculation à des animaux dératés est suivie, après 3 ou 4 jours, de l'apparition, dans le sang, de spirilles de plus en plus nombreux (fig. 164). La mort survient presque constamment (Soudakewitch).

II. *Diagnostic de la fièvre récurrente.*

Il sera facile à établir, *au moment de l'accès*, par le simple examen, entre lame et lamelle, d'une goutte de sang prélevée au niveau de la pulpe digitale ou du lobule de l'oreille. *Dans l'intervalle des accès*, la ponction de la rate et la recherche des spirilles dans le suc splénique, demeure sans caractère pratique. On pourrait à la rigueur mettre à profit la remarque suivante, de MM. Gabritchewsky et Löwenthal. Dans un mélange de sang infecté et de sérum humain normal, les spirilles vivent, à la température ordinaire, pendant environ 160 heures. Au contraire, dans un mélange de sang infecté et de sérum de malade apyrétique, ils sont tous immobilisés après 2 à 4 heures. Toutefois, ce procédé de diagnostic suppose qu'on a à sa disposition, en même temps qu'un individu apyrétique, un autre individu en pleine maladie ; de plus, l'action bactéricide du sérum, après la crise, n'est pas absolument constante (Bardach).

Dans des cas très rares (puisque la mortalité ne dépasse guère 1 pour 100), la question du diagnostic se posera *à l'autopsie* et il faudra rechercher le spirille dans les *coupes* de rate. On plongera des fragments de l'organe dans un mélange, à parties égales, d'une solution aqueuse de bichromate de potasse à

5 pour 100 et d'une solution saturée de sublimé dans le chlorure de sodium physiologique. Après 24 heures de séjour, les pièces sont transportées dans de l'alcool à 60°, puis dans des alcools de plus en plus forts, jusqu'à atteindre 95°. On inclut enfin à la paraffine. Les coupes sont colorées à l'aide d'un mélange de bleu de méthylène et de tropéoline dont voici la formule :

Solution alcoolique de tropéoline 00 à 1 p. 100..	5	volumes.
Solution aqueuse concentrée de bleu de méthylène.	10	—
Eau distillée.	10	—

Agiter et ajouter, par 25 centimètres cubes, 5 gouttes de potasse à $1/10^3$.

Après 24 heures, on lave à l'eau, on déshydrate rapidement, à l'aide d'un mélange (*ââ*) d'alcool absolu et d'éther, on éclaircit au xylol et on monte au baume. Les globules rouges sont teintés en jaune orange, les spirilles en bleu clair, tout le reste de la préparation en bleu, les noyaux plus intensivement. Cette méthode est due à M. Nikiforoff. Soudakewitch fixe par la liqueur de Müller et durcit par l'alcool absolu. Il évite systématiquement d'inclure dans la paraffine et coupe à main levée. Il conseille de traiter les préparations par le carmin, puis par le bleu de méthylène phéniqué étendu ; on déshydrate dans l'alcool chargé de bleu, et on éclaircit, d'abord dans l'huile d'aniline chargée de bleu, puis dans l'huile d'aniline ordinaire. On passe finalement dans l'essence de cèdre et on monte au baume.

GANGRÈNES ET SUPPURATIONS GANGRENEUSES OCCASIONNÉES PAR LES ANAÉROBIES DE VEILLON

M. Veillon et ses collaborateurs (Zuber, Hallé, Rist, Cottet, Guillemot) ont décrit *toute une série de bactéries anaérobies*, susceptibles de produire la « gangrène vraie » des tissus. Ces organismes se rencontrent *dans les pus fétides et les foyers gangreneux*, où l'examen microscopique les avait fait voir depuis longtemps. Ils sont cependant demeurés inconnus jusqu'à ces dernières années, parce que les bactériologues ne soumettaient point les produits qui les contiennent aux cultures à l'abri de l'air.

Le rôle des microbes de Veillon apparaît de jour en jour plus important et il convient de bien connaître leurs caractères diagnostiques. Nous les exposerons donc avec les détails suffisants pour chacune des espèces suivantes, qui sont les plus répandues :

Coco-bacille de Veillon et Morax.
Bacillus nebulosus.
Bacillus perfringens.
Bacillus ramosus.
Bacillus fragilis.
Bacillus fusiformis.
Bacillus furcosus.
Bacillus thetoïdes (ou funduliformis).
Bacillus serpens (ou radiiformis).
Spirillum nigrum.
Staphylococcus parvulus.
Micrococcus fœtidus.
Diplococcus reniformis.

Cocco-bacille de Veillon et Morax.

Isolé d'une péricystite gangreneuse. Il forme de très courts bâtonnets dans le pus ; dans les cultures, on observe, en même temps que ces bâtonnets, la présence de bacilles véritables. Dans la gélose glucosée, il donne de petites colonies rondes, opaques, grisâtres, très fétides. Il dégage peu de gaz. Enfin, il produit des abcès sous la peau du cobaye. Son étude n'a pas encore été approfondie.

Bacillus nebulosus (Hallé).

Rencontré dans les suppurations fétides de l'appareil génito-urinaire et dans la gangrène du poumon. C'est un petit bâtonnet, décoloré par le Gram. Il pousse lentement dans la gélose glucosée. Les colonies y offrent un aspect nébuleux (qui justifie le nom donné à cette espèce) et présentent une sorte de noyau central, brunâtre. Le bacille ne se développe pas au-dessus de 37°. Il ne produit point de gaz. Ses propriétés pathogènes sont inconstantes ; il donne parfois des suppurations fétides mortelles sous la peau des animaux.

Bacillus perfringens (Veillon et Zuber).

On le trouve *dans presque tous les pus gangreneux* (assez souvent dans les appendicites), mais toujours en minorité par rapport aux autres microbes anaérobies. Il a été aussi rencontré, par M. Guillemot, dans un cas de gangrène gazeuse. Il se multiplie après la mort et peut envahir abondamment les organes. C'est un gros bâtonnet immobile, de la taille de la bactéridie charbonneuse ; les extrémités en sont nettement

limitées et carrées ; plusieurs éléments restent quelquefois unis bout à bout. Dans le pus, il est entouré d'une capsule bien colorable. Il ne forme pas de spores. Enfin, il se colore par la méthode de Gram.

Les *cultures* en milieux sucrés se caractérisent par leur rapide développement, avec formation d'une quantité considérable de gaz. Dans la gélose profonde, à 37°, la croissance débute déjà au bout de 3 heures, avec apparition de quelques bulles gazeuses. Après 24 heures, le milieu se trouve disloqué en fragments qui viennent soulever le bouchon d'ouate du tube ; il se dégage une odeur de beurre rance. Sur la gélose, en strie, on observe un semis de colonies, rappelant celles du streptocoque. Le bacillus perfringens pousse très rapidement dans le bouillon, qu'il trouble fortement ; on voit de petites bulles de gaz sortir du liquide et venir crever à la surface. Puis, il se forme un dépôt abondant et le milieu commence à s'éclaircir au bout de 48 heures. Dans la gélatine, apparaissent, en 48 heures, des colonies brunâtres et quelques bulles de gaz ; le milieu n'est pas liquéfié.

La *vitalité* du bacille se montre très faible. Il faut repiquer les colonies au bout de 3 à 4 jours quand elles ont poussé à l'étuve, un peu plus tard si la croissance s'est faite à la température ordinaire.

Le b. perfringens est très *pathogène* pour le cobaye, auquel il donne, par inoculation sous-cutanée, un phlegmon gazeux, tout à fait analogue à celui que produit le vibrion septique. Les lapins sont moins sensibles ; ils meurent cependant, en 8 à 10 jours, quand on les a inoculés sous la peau, après avoir présenté un phlegmon gangreneux. L'inoculation dans les veines les tue dans le même temps.

Bacillus ramosus (Veillon et Zuber).

Il se rencontre *assez fréquemment dans le pus gangreneux* (otites, gangrènes pulmonaires, appendicites). Il affecte d'ordinaire la forme d'un bâtonnet fin, un peu plus gros que le bacille de la septicémie des souris, mais parfois il devient plus long et plus épais, rappelant assez bien le microbe de la diphtérie. Il se trouve alors disposé en amas. Le b. ramosus forme, dans les cultures, des pseudo-filaments; à un fort grossissement, on s'aperçoit que ceux-ci sont constitués par de petits bâtonnets accolés bout à bout ; il existe aussi des individus ramifiés. Le bacille est immobile. Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et par la méthode de Gram. Il ne pousse qu'à la température de l'étuve. Dans la gélose par piqûre, les colonies représentent de petits points grisâtres, puis jaunâtres ; sur la gélose en strie, ce sont de petits amas transparents. Dans le bouillon, on observe un trouble uniforme et il se dépose un fin précipité blanchâtre. Les cultures dégagent une odeur fétide très caractéristique, mais produisent peu de gaz. Le b. ramosus se montre très vivace, mais n'engendre pas de spores. Il est pathogène pour le lapin, le cobaye et la souris, qu'il tue sous la peau en 7-8 jours, avec abcès local.

Bacillus fragilis (Veillon et Zuber).

Le bacillus fragilis se trouve *constamment dans le pus gangreneux*. Il est plus petit que le b. ramosus. Droit et court, il offre souvent l'aspect d'un diplocoque ; ses deux extrémités paraissent plus réfringentes que le centre, lorsqu'on l'examine sans coloration ; elles fixent aussi les couleurs mieux que le centre.

Dans les cultures, le b. fragilis devient souvent assez épais ; il présente quelquefois des formes courtes ; ailleurs, au contraire, on le voit s'allonger. Il se décolore par le Gram.

Dans le bouillon, il pousse faiblement, en ne donnant qu'un léger louche. Dans la gélose par piqûre, il se développe tardivement ; ce n'est que du 3e au 4e jour qu'on voit apparaître de très fines colonies, sous forme de gouttelettes orangées, translucides. Il est nécessaire d'examiner soigneusement les tubes au microscope, avec un faible grossissement, pour ne pas méconnaître la présence de ces colonies. Sur la gélose en strie, l'apparence rappelle celle du pneumocoque. Dans la gélatine, le développement demande 8-10 jours et se traduit par de petits points, sans caractères spéciaux. Les diverses cultures sont fétides, mais dégagent peu de gaz. Elles meurent en 7-8 jours à l'étuve, en 20-30 jours à la température ordinaire.

Le bacillus fragilis tue le cobaye sous la peau ; si la mort est rapide, il se forme un petit abcès au point inoculé ; si la mort ne survient qu'au bout d'un mois, on observe un véritable phlegmon gangreneux. Il tue le lapin, dans les veines, par cachexie et l'on ne retrouve pas l'organisme pathogène à l'autopsie ; les cultures mortes produisent d'ailleurs le même résultat.

Bacillus fusiformis (Veillon et Zuber).

Fréquent dans les appendicites. Fusiforme dans le pus, assez polymorphe dans les cultures, non coloré par le Gram. Dans la gélose par piqûre, il donne de petites colonies grisâtres, qui brunissent ensuite ; sur gélose en strie, on observe un aspect colibacillaire. Dans la gélatine, il pousse en 5-6 jours, sans liquéfier le milieu. Enfin, dans le bouillon, il se traduit

par un trouble et un dépôt abondants. Les cultures sont fétides, mais ne dégagent que peu de gaz. A l'étuve, elles ne vivent que 4-5 jours ; à la température de la chambre, la durée est moins courte. Le b. fusiformis produit des abcès bénins, sous la peau du cobaye et du lapin.

Bacillus furcosus (Veillon et Zuber).

Assez rare. En forme de γ dans le pus, plus rameux encore dans les cultures. Immobile. Non coloré par le Gram. Il ne pousse qu'à l'étuve (en 3-4 jours). Il forme, sur la gélose, des colonies fines et discrètes et, dans la gélose, des colonies presque invisibles (il faut recourir à l'examen microscopique pour les découvrir). Dans le bouillon, il se caractérise par un fin précipité. Les cultures vivent 15 à 20 jours, dégagent peu de gaz et répandent une odeur aigrelette. Le b. furcosus donne des abcès, le plus souvent bénins, lorsqu'on l'injecte sous la peau des cobayes.

Bacillus thétoïdes (Veillon et Zuber) ou funduliformis (Hallé).

Le bacillus thétoïdes, étudié d'abord par MM. Veillon et Zuber, a été ensuite isolé par M. Rist du pus d'une mastoïdite et par M. Guillemot d'un foyer de gangrène pulmonaire. Il paraît identique au b. funduliformis de M. Hallé, retrouvé par MM. Veillon et Morax dans une péricystite gangreneuse. Sous sa forme la plus caractéristique, il se présente comme un bacille large, ressemblant à un ovoïde allongé et se colorant d'une manière inégale ; les parties les plus teintées se trouvent souvent au centre, ce qui donne au micro-organisme une certaine analogie avec la grecque θ. A côté de cette forme, on en trouve beau

coup d'autres, le b. thétoïdes étant essentiellement polymorphe. Il se décolore par la méthode de Gram.

Cultivé en profondeur dans la gélose sucrée, il apparaît, au bout de 48 heures (à 37°), sous forme de fines colonies arrondies, translucides, d'un blanc jaunâtre. Dans le bouillon, il forme de petits flocons mucoïdes, qui tombent au fond du vase. Les tubes de gélatine, placés à 22°, restent stériles. Le b. thétoïdes ne dégage guère de gaz, mais répand une odeur fétide. *Inoculé* sous la peau des cobayes, il produit des escarres ou des abcès et la mort survient souvent au bout de 7 à 12 jours.

Bacillus serpens (Veillon et Zuber), ou radiiformis (Rist et Guillemot).

Le bacillus serpens de MM. Veillon et Zuber a été retrouvé par M. Rist dans le pus d'une mastoïdite, par M. Guillemot dans un foyer de gangrène pulmonaire et étudié par eux sous le nom de bacillus radiiformis. C'est un bâtonnet assez épais, qui se décolore par le Gram. Dans la gélose par piqûre, les colonies apparaissent rapidement et présentent d'habitude des prolongements irréguliers à leur périphérie. Sur la gélose en strie, l'aspect est celui du pneumocoque. Le b. serpens liquéfie la gélatine ; le milieu liquéfié reste clair, tandis que la culture se dépose en épais flocons au fond du tube. Le bacille présente, dans la gélatine liquéfiée, un mouvement ondulatoire très net, d'où le nom qui lui a été donné. En bouillon sucré, on obtient, au bout de 48 heures, un trouble qui va en s'accentuant ; puis un dépôt blanchâtre se forme après quelques jours. Le bacillus serpens dégage une odeur fétide, mais il ne donne qu'un faible dégagement de gaz. Il est pathogène pour le cobaye,

le lapin et la souris, dans les mêmes conditions et de la même façon que le b. ramosus.

Spirillum nigrum (Rist).

Découvert dans les suppurations de l'oreille, il se présente sous forme de petits éléments minces, incurvés en parenthèse, ou en S; les formes rectilignes sont rares. Examinés sans coloration, ces organismes montrent, pour la plupart, à une de leurs extrémités ou en leur milieu, un petit grain noir qui augmente l'épaisseur apparente du microbe. La fréquence des grains paraît diminuer après un grand nombre de réensemencements. Le pigment manquait aussi dans un échantillon, isolé par M. Guillemot, d'un cas de gangrène pulmonaire ; à cette particularité près, ce spirille paraissait identique à celui que nous décrivons. Le spirillum nigrum est extrêmement mobile. Il se colore assez difficilement et le centre, aminci, demeure toujours moins teinté que les extrémités. Il ne prend pas le Gram.

Les cultures s'obtiennent aisément et abondamment dans tous les milieux et particulièrement dans la gélatine. Elles dégagent une odeur très fétide, rappelant celle de l'œuf pourri et perceptible à distance. Le spirillum nigrum ne paraît pas très pathogène.

Staphylococcus parvulus (Veillon et Zuber).

Rencontré dans les appendicites. C'est un coccus très fin, plus petit que le staphylocoque doré et disposé en diplocoque ou en amas. Il offre, dans les cultures, les mêmes caractères morphologiques que dans le pus. Il est immobile. Les couleurs basiques d'aniline le teintent facilement, mais d'une façon peu intense. La méthode de Gram le décolore.

Il se développe lentement à 22°, très rapidement à 37°. Ensemencé dans la gélatine, il forme, au bout d'une huitaine de jours, de petites colonies opaques, granuleuses, brunâtres, dont les contours sont quelquefois légèrement ondulés. Le milieu n'est pas liquéfié. Dans la gélose par piqûre, le développement est rapide ; les colonies se montrent jaunâtres, à contours bien limités. Sur la gélose en strie, on observe de petits points fins et transparents. Le bouillon se trouble rapidement, puis laisse déposer un léger précipité. Le staphylococcus parvulus dégage peu de gaz, mais offre une odeur fétide. Il est pathogène pour le cobaye et le lapin, auquel il donne des abcès sous-cutanés.

Micrococcus fœtidus (Veillon).

Rencontré dans divers pus fétides, où il se présente sous l'apparence de cocci isolés ou de diplocoques. Il conserve le même aspect dans les différents milieux, mais forme en outre, dans le bouillon, des petites chaînettes de quatre à cinq éléments. Il se colore bien par la méthode de Gram. Les colonies en gélose sont arrondies, de faible volume ; elles apparaissent du 2e au 3e jour et ne s'accroissent que lentement. En bouillon, on obtient un léger trouble. Le micrococcus fœtidus ne pousse pas dans la gélatine. Il ne donne de gaz qu'assez rarement et toujours en petite quantité. Il dégage une odeur très fétide. Enfin il est pathogène pour le cobaye.

Diplococcus reniformis (Cottet).

C'est un curieux anaérobie des suppurations péri-urétrales, qui *simule absolument le gonocoque*. Dans la gélose, il croît à 37°, en 36 à 48 heures, sous forme

de petites colonies blanchâtres. Il trouble rapidement le bouillon ; celui-ci s'éclaircit ensuite, à mesure que se forme un dépôt. Il ne pousse pas en gélatine. Les cultures sont fétides, mais ne dégagent point de gaz. Le diplococcus reniformis donne des abcès sous la peau du cobaye.

AFFECTIONS HUMAINES DUES AUX STREPTOTHRIX

Nous étudierons d'abord le pied de Madura dont le parasite a été découvert par M. Vincent, puis nous dirons quelques mots de l'érysipéloïde de Rosenbach et de trois streptothrix pathogènes, celui d'Eppinger, celui de Rivière et celui de Dubois Saint-Sévrin.

Pied de Madura.

I. Principaux caractères du streptothrix de Vincent.

Le pied de Madura est, comme on le sait, une affection de l'Inde. On l'observe aussi, bien que plus rarement, en Italie et en Algérie. Il se caractérise par une tuméfaction énorme du pied. Celui-ci est parsemé de nodules qui se ramollissent, s'ouvrent et laissent à leur place des fistules rebelles. Parfois apparaissent des éruptions bulleuses, auxquelles succèdent des ulcérations phagédéniques. Des fistules et des ulcérations, s'écoule un pus sanieux, contenant des *grains* diversement colorés. Les médecins anglais admettent deux variétés de pied de Madura, l'une « mélanique », dans laquelle les grains sont noirs, l'autre « pâle », dans laquelle ils sont blancs, jaunes ou même rouges.

Examinés au microscope, ces grains, dont le volume ne dépasse guère celui d'une tête d'épingle, apparaissent constitués par de nombreux filaments, étroitement enchevêtrés et ramifiés. On ne constate jamais de massues, comme cela se voit dans l'actinomycose.

L'aspect, dans les cultures, est très analogue (fig. 165).

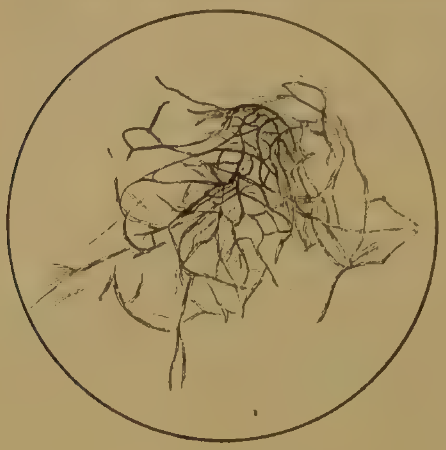


Fig. 165. — Streptothrix Maduræ. Culture en bouillon.

Le parasite se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram.

Le streptothrix de Vincent pousse mal dans le bouillon simple. En bouillon glycériné, il donne des flocons blancs, rappelant ceux de l'actinomyces; le milieu reste clair. Sur gélose glycérinée, ce sont des colonies ombiliquées ou plissées, blanches, puis rouges, très adhérentes. Sur pomme de terre, on voit apparaître de petites éminences blanchâtres, qui aboutissent à former des végétations mamelonnées. Ces colonies rougissent après un certain temps; finalement, la teinte devient absolument fuchsinoïde (rouge sombre, avec reflets irisés). En gélatine, le développement reste peu abondant et on ne note pas de liquéfaction. Le streptothrix ne se cultive pas sur sérum. Les milieux qui lui conviennent véritablement le mieux sont les milieux végétaux: l'infusion de foin ou de paille, l'infusion de navets, de carottes ou de pommes de terre, ou encore la gélatine à l'infusion de foin, additionnée de 4 pour 100 de glycérine et de 4 pour 100 de glucose. Le streptothrix du pied de Madura pousse dans le lait, sans le coaguler. Il est exclusivement aérobie et assez résistant à la dessiccation. Il forme des *arthrospores*, surtout au niveau des parties exposées à l'air; aussi voit-on souvent les vieilles cultures sur milieux solides se recouvrir d'une

poussière blanche, due à cette production de spores.

Les inoculations ont constamment fourni des résultats négatifs.

II. Diagnostic bactériologique du pied de Madura.

Il sera donc assuré par l'examen microscopique et les cultures. Les grains, trouvés dans le pus, seront



Fig. 166. — Streptothrix Maduræ dans les tissus.

traités par la potasse à 3 pour 100 et montés dans la glycérine. L'absence de formes en massue permettra de les distinguer de ceux de l'actinomycose. L'examen peut porter également sur des nodosités obtenues par biopsie ; on les fixera et on les débitera en *coupes* qui seront colorées par le carmin de Orth et la méthode de Gram (Vincent) (fig. 166). Les nodosités sont

composées de pseudo-tubercules élémentaires, au centre desquels se trouvent les filaments du parasite. A la périphérie, on rencontre de nombreux leucocytes, mais les cellules géantes demeurent très rares.

Pour cultiver le streptothrix, on cautérisera la surface de la peau au niveau d'un nodule en voie de ramollissement; on ponctionnera avec un bistouri flambé, et, par l'ouverture, on introduira l'extrémité d'une pipette dans laquelle on aspirera le contenu de la tumeur. On ensemencera ensuite dans l'infusion de foin ou de paille, ou bien sur la gélatine, préparée avec une infusion végétale. L'association fréquente des staphylocoques pyogènes rend souvent l'obtention des cultures assez ardue.

Érysipéloïde de Rosenbach.

Sorte d'érysipèle chronique, siégeant presque toujours aux doigts. Il est peu douloureux et s'observe de préférence chez les gens qui sont exposés à manier les denrées animales (cuisiniers, restaurateurs, marchands de gibier, etc.). Le streptothrix pathogène (encore mal connu) ne pousse que sur gélatine et à basse température. M. Rosenbach se l'est inoculée à lui-même avec succès. Il s'en est suivi une inflammation éphémère, comme la maladie naturelle elle-même, dont la durée varie en général de 1 à 3 semaines.

Streptothrix d'Eppinger (fig. 167).

Il a été rencontré dans un cas d'abcès cérébral, avec pseudo-tuberculose pulmonaire, ganglionnaire et osseuse et paraît à peu près identique à un autre streptotrhix, isolé d'un abcès du cerveau par MM. Ferré et Faguet. En bouillon glycériné, il donne des flocons et un voile épais, d'une coloration brique. Sur gélose

glycérinée, c'est une couche mamelonnée, de même couleur, grasse, terne, ressemblant absolument à celle que donnent certains b. tuberculeux aviaires. L'aspect est identique sur pomme de terre glycérinée. Inoculé au lapin, par la voie sous-cutanée, il le tue avec un abcès local et des granulations dans les organes; injecté dans le péritoine du cobaye, il le fait périr avec une péritonite pseudo-tuberculeuse.

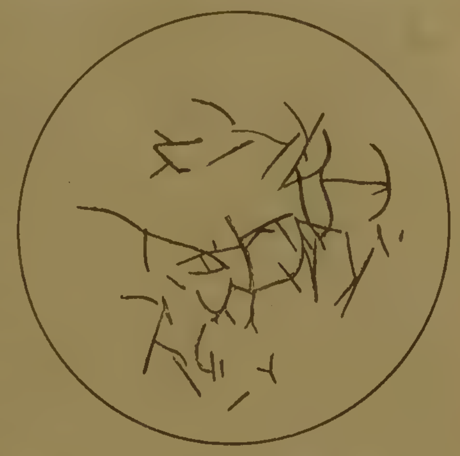


Fig. 167. — Streptothrix d'Eppinger. Culture en bouillon.

Streptothrix de Rivière.

Trouvé dans les crachats et les abcès d'un malade. Il est essentiellement aérobie. Il liquéfie la gélatine, saponifie les corps gras en s'assimilant la glycérine et décompose les glucosides. Il produit une matière colorante jaune, soluble dans l'éther, insoluble dans l'eau, insensible aux acides et aux alcalis. Enfin il se montre pathogène pour les animaux, quand on inocule en même temps un peu d'acide lactique.

Streptothrix aurea.

Trouvé par M. Dubois Saint-Sévrin dans une ulcération de l'angle interne de l'œil, recouverte d'un exsudat diphtéroïde. Il affecte une forme courte dans les fausses membranes, filamenteuse dans les cultures.

En bouillon, il se développe sous l'aspect de petites boules blanches. La gélatine, ensemencée, se liquéfie rapidement. Sur gélose, ce sont des colonies sèches, verruqueuses, contournées, qui se recouvrent d'une poussière grisâtre (spores). Sur sérum de bœuf coagulé, on observe une culture grise et cornée ; le milieu est vite digéré. La culture est plus aplatie sur sérum humain, la liquéfaction se montre moins rapide et l'évolution concentrique des colonies donne lieu à des formes en cocarde tout à fait caractéristiques. La culture sur pomme de terre glycérinée prend une teinte jaune d'or et se contourne en circonvolutions. Les inoculations ont toujours fourni des résultats négatifs.

AFFECTIONS HUMAINES DUES AUX BLASTOMYCÈTES SACCHAROMYCES DE CURTIS

Le rôle pathogène des levures, jadis considéré comme effacé, tend à s'affirmer de plus en plus. MM. Achalme et Troisier ont décrit, chez l'homme, une *angine* causée par une levure. M. Busse a rencontré, lui aussi, une levure dans un *abcès* du tibia (la mort survint par pyémie, avec généralisation du parasite). On connaît, d'autre part, plusieurs cas de *dermatoses* dues aux blastomycètes ; ce sont presque toujours des affections à marche chronique, simulant la tuberculose cutanée.

Nous décrirons simplement ici le saccharomyces subcutaneus tumefaciens, découvert et étudié en détail par M. Curtis ; il peut être donné comme le type de la levure pathogène.

Saccharomyces de Curtis.

Isolé chez un homme atteint d'une tumeur myxoïde de la cuisse et d'une tumeur lombaire abcédée, pour lesquelles on était intervenu chirurgicalement. La mort se produisit au milieu de symptômes méningitiques, 10 mois après l'intervention. Il ne fut pas pratiqué d'autopsie.

Le parasite (fig. 168-169) se présente sous forme de cellules rondes ou ovales, entourées d'une membrane à double contour et munies d'une capsule dans l'organisme, les vieilles cultures et les milieux sucrés. Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram. Il se développe lentement sur gé-

lose, quand il émane de l'organisme ; il pousse rapidement, au contraire, s'il vient d'une culture. Il donne, dans les deux cas, des colonies blanches sans grand caractère. Il croît, en 48 heures, dans la gélatine ; celle-ci n'est pas liquéfiée. Sur pomme de terre, les colonies brunissent à la longue. Le développement est très précoce et très abondant sur pomme de terre glycérinée. Le saccharomyces ne pousse pas sur sérum. En bouillon, la croissance reste lente et médiocre ; elle se traduit par des flocons

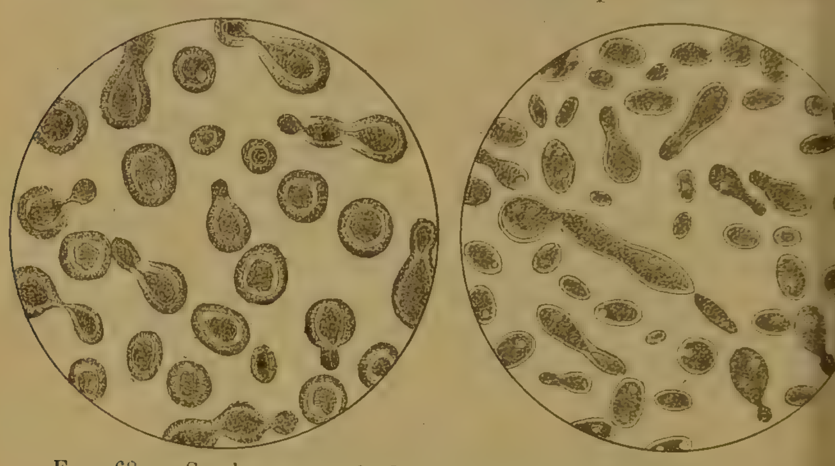


Fig. 168. — Saccharomyces de Curtis. Culture en solution de peptone, acide et sucrée.

Fig. 169. — Saccharomyces de Curtis. Culture sur gélose.

blanchâtres. Le moût de bière et l'eau de touraillons constituent par contre d'excellents milieux.

Le microbe de Curtis se montre exclusivement aérobie. Il croît de 15° à 39°. Son pouvoir fermentaire est peu développé ; il n'attaque ni le lactose, ni le maltose. L'acidité du milieu nutritif a une grande influence sur le développement. Dans l'eau peptonisée alcaline, le parasite ne pousse pas. Il pousse faiblement, si la réaction a été neutralisée. L'eau peptonisée acidifiée constitue, par contre, un bon milieu

Les acides tartrique et chlorhydrique sont ceux qui conviennent le mieux et l'acidité la plus favorable correspond à $0^{gr},3$ ou $0^{gr},5$ d'acide sulfurique par litre. La vitalité, sur gélose, se conserve au moins 6 mois.

Le cobaye peut être tué par inoculation intrapéritonéale. L'injection dans les veines du lapin n'est suivie d'aucun effet. L'inoculation, dans le tissu cellulaire du même animal, donne un abcès local, dans



Fig. 170. — Saccharomyces de Curtis. Coupe de la tumeur d'un rat.

lequel le microbe meurt rapidement. Chez le rat blanc, injecté sous la peau, on obtient, après 8 à 10 jours, une tumeur identique à celle de l'homme ; elle augmente très vite de volume, puis des métastases se produisent. Chez la souris et chez le chien, tout se borne à une lésion locale. Chez le rat, comme chez l'homme, la tumeur serait constituée par du tissu conjonctif, infiltré de nombreux parasites. Toutefois, chez l'animal, on n'observerait pas de réaction leucocytaire marquée (fig. 170).

MUGUET

L'*oïdium albicans* représente l'agent pathogène du muguet, buccal ou extra-buccal. Il a été également rencontré dans des angines pseudo-membraneuses (Teissier, Stoos) et dans des suppurations péri-œsophagiennes et sous-maxillaires. On l'a même trouvé dans des abcès de cerveau, des abcès miliaires des reins, des abcès pulmonaires, etc. Dans diverses angines (scarlatineuses, herpétiques, diphtériques) il peut exister à l'état associé. Enfin, il n'est pas rare dans la bouche des personnes saines et dans l'air des salles d'hôpital.

Caractères morphologiques de l'oïdium albicans.

L'oïdium albicans se présente sous deux aspects, la *forme levure* et la *forme mycélienne*; c'est donc une myco-levure. Dans l'enduit buccal du muguet (fig. 171), les deux types coexistent, mais les levures prédominent au niveau des parties superficielles. Elles existent seules dans les manifestations pseudo-membraneuses (Teissier).

Dans les cultures sur solides, on observe le plus souvent des levures, dans les cultures en liquides, le plus souvent des filaments; dans les vieilles cultures, il n'est pas rare de rencontrer des *formes kystiques*. Enfin, dans l'organisme des animaux inoculés, le parasite se montre toujours filamenteux. Il se colore à l'aide de toutes les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram.

Caractères de culture.

Sur gélose neutre ou légèrement alcaline, la culture est tardive et peu abondante. Ce sont des colonies grisâtres et lisses. Au microscope, la forme levure prédomine. Sur gélose acide, c'est une nappe crémeuse, unie, grisâtre ou rosée. Au bout de quelques jours, le milieu devient alcalin, par formation de



Fig. 171. — Muguet buccal, d'après Besson.

carbonate d'ammoniaque. L'aspect se modifie alors et se montre identique à celui qu'on observe sur la gélose fortement alcaline. Le changement se produit rapidement, si la gélose a été acidifiée à l'acide acétique, plus tardivement, lorsque l'acide employé est l'acide chlorhydrique ; il ne se manifeste jamais avec l'acide sulfurique. Sur gélose fortement alcaline, le développement est très rapide. On observe un enduit

continu, d'abord surmonté de saillies verruqueuses, puis plissé, membraniforme et chagriné. La forme filamenteuse est de beaucoup prédominante.

En bouillon neutre ou légèrement alcalin, la croissance se montre assez rapidement abondante. Après 2 à 3 jours, il se forme, au fond du tube, un dépôt constitué surtout par des filaments. La culture se fait plus vite en bouillon acide. Les levures l'emportent d'abord, puis les filaments ; le milieu ne devient pas alcalin. Le développement est moins riche en bouillon fortement alcalin, où les filaments sont plus nombreux qu'en bouillon acide. Enfin, la culture reste très pauvre en bouillon glycériné. Sur carottes cuites, légèrement acides, les colonies apparaissent blanches, lisses, glacées. L'oïdium pousse d'abord sous forme de levures, puis la réaction devient neutre et les filaments apparaissent. Le développement est tardif et maigre en gélatine. On observe de petites colonies blanches, composées presque exclusivement de levures ; le milieu n'est pas liquéfié.

Caractères d'inoculation.

L'inoculation, sous la peau du lapin, produit un abcès local de longue durée ; quelquefois le parasite se généralise, mais la mort peut arriver sans métastases viscérales. L'injection de fortes doses (10 à 15 centimètres cubes de culture liquide) dans le péritoine, détermine simplement un exsudat suivi de quelques adhérences ; l'animal guérit rapidement. L'inoculation dans les veines, de 1 centimètre cube à 1^{cc},5 de culture en bouillon, amène la mort en 5 ou 6 jours. L'animal s'émacie ; il offre une parésie des membres postérieurs et quelquefois des phénomènes cérébelleux. A l'autopsie, les lésions rénales sont constantes ; elles se présentent sous forme de petits nodules (pseudo-

tubercules). On trouve quelquefois aussi des granulations dans divers organes. Les parasites passent dans la bile et dans l'urine, jamais dans le sang. L'injection dans l'artère fémorale est suivie des mêmes effets que l'injection intraveineuse. Le lapin survit, au contraire, si l'inoculation a été faite dans la veine porte. Il survit le plus souvent aussi lorsqu'elle a été poussée dans l'artère rénale (Roger). Enfin, quand on excorie la muqueuse vaginale et qu'on ensemence ensuite l'oïdium albicans, on note, au bout de 48 à 72 heures, le développement d'une fausse membrane.

Chez le cobaye, l'inoculation sous la peau détermine des abcès. L'injection intrapéritonéale est suivie de la formation d'un épanchement séro-purulent, avec fausses membranes épaisses. L'injection dans la plèvre amène presque toujours la mort. A l'autopsie, on trouve un épanchement pleural et péricardique et on rencontre les parasites dans le sang, la rate et même le foie.

L'oïdium qui provient des angines bactériennes se montre en général inoffensif. Celui des plaques de muguet est au contraire virulent. Cette virulence s'atténue rapidement dans les cultures. Toutefois, à l'aide de passages par le lapin, on peut obtenir des cultures qui tuent cet animal, dans les veines, en 3 ou 4 jours, à la dose de $0^{cc},1$. L'association du staphylocoque ou du streptocoque favorise la production des fausses membranes vaginales et, d'une façon générale, renforce l'activité de l'oïdium (Stoos).

TEIGNES TONDANTES DE L'HOMME

On admet aujourd'hui, avec M. Sabouraud, qu'il existe *deux espèces de* teignes *tondantes* : la teigne tondante *à grosses spores, due aux tricophytons* (soit ectothrix, soit endothrix) *et* la teigne tondante *à petites spores*, appelée encore *teigne tondante de Grüby*. M. Sabouraud crut d'abord que cette dernière était causée par un tricophyton à petites spores, qu'il appela tricophyton microsporon ; il s'aperçut ensuite qu'elle était produite, en réalité, par un microsporon, le *microsporon Audouini*, découvert jadis par Grüby.

Nous décrirons successivement, d'après M. Sabouraud, la technique générale, applicable à l'étude de toutes les mycoses cutanéo-pilaires — les affections causées par les tricophytons —, puis la tondante spéciale de Grüby.

I. Technique générale.

Examen microscopique des cheveux.

Les cheveux seront arrachés, placés sur une lame, dégraissés par l'éther, puis traités par la potasse à 40 pour 100 et recouverts d'une lamelle. Une *première préparation*, destinée à vérifier l'habitat du parasite, est chauffée légèrement, sans atteindre l'ébullition. De cette façon, le cheveu se trouve simplement éclairci ; il n'est pas dissocié ; les spores sont vues en place. Une *seconde préparation*, destinée à l'étude morphologique, est chauffée, au contraire, jusqu'à ébullition

commençante ; le cheveu se trouve dissocié et le parasite mis en liberté. On ne craindra pas d'employer d'assez forts grossissements, ils sont souvent indispensables. L'usage de l'objectif à immersion est même parfois indiqué pour les détails.

Cultures en général.

Le cheveu est recueilli sur une lame flambée. Avec un fin scalpel stérile, on sépare la racine de la partie aérienne et on coupe cette racine en le plus grand nombre de tronçons possible. Chaque tronçon est porté, avec un fil de platine, sur le milieu nutritif. Il y a souvent avantage à répartir celui-ci dans des matras coniques, où les colonies peuvent se développer d'une façon régulière. On choisira, d'ordinaire, certains *milieux déterminés*, de façon à différencier les espèces (il existe, par exemple, plus de 20 types de tricophytons). Les milieux azotés (tels que les milieux courants) doivent être rejetés. La pomme de terre permet de distinguer aisément les tricophytons du microsporon Audouini, mais elle est insuffisante pour les différenciations fines. La gélose au moût de bière double serait excellente, si sa composition n'offrait beaucoup de variations. Le *milieu d'épreuve* suivant (Sabouraud) présente tous les avantages du précédent et possède, de plus, une composition constante :

Eau.	100
Maltose (de l'usine de Creil).	5
Peptone (sulfurique de Chassaing). . .	0,75 à 0,80
Gélose.	1,40

Il est bon de cultiver également les parasites sur des milieux à base d'autres sucres (mannite, lactose, glucose, etc.).

Associations cryptogamiques. Cultures pures.

Les associations cryptogamiques sont *presque constantes* dans les produits examinés. Elles apparaissent, facilement ou non, suivant la constitution du milieu. Les commensaux restent masqués dans les milieux très sucrés, tels que la gélose au moût de bière double. Au contraire, dans les milieux très azotés, comme la gélose au moût de bière au tiers, additionnée de 1 pour 100 de peptone, ils deviennent toujours visibles après quelques semaines. Sur pomme de terre, où les tricophytons meurent en 18 à 20 jours, on les voit aussi se développer par la suite.

Pour établir un diagnostic de tricophyton et d'espèce de tricophyton, *il est inutile de purifier les cultures,* les moisissures associées restant indéfiniment latentes, si on fait usage du moût de bière ou du milieu d'épreuve. Pour des recherches précises, il faut, au contraire, procéder à la purification. On a alors le choix entre *deux méthodes,* celle de Král et celle de Sabouraud. La méthode de Král est la plus exacte et la plus rapide, mais aussi la plus ardue. Elle consiste à diluer la semence, préalablement broyée avec de la silice. La gélatine, ensemencée avec cette dilution, sera coulée en boîtes de Petri. On cherchera alors les spores au microscope et on les marquera à l'encre. Quand des colonies se développeront aux points marqués, on sera sûr qu'elles sont pures. La méthode de Sabouraud, suffisamment exacte et exempte de difficultés, demande malheureusement deux mois d'attente. On ensemence un cheveu sur gélose au moût de bière double. Quand le duvet mycélien apparaît, on l'effleure avec un fil de platine et on repique, plus haut, dans le même tube. Quand se montre le nouveau duvet, on l'effleure encore et on fait deux stries sur pomme

de terre. Lorsque cette dernière culture s'est développée, on ensemence enfin quatre tubes de gélose au moût de bière, avec quatre points différents de la colonie. Après un mois, on regarde si les commensaux ont poussé ou non sur les points de la pomme de terre où les prises ont été faites. Si oui, on jette les repiquages correspondants ; sinon, on les garde.

II. *Affections causées par les tricophytons. Inoculations expérimentales.*

Tandis que le microsporon Audouini détermine une affection univoque, propre à l'homme et toujours localisée au cuir chevelu, les tricophytons produisent (suivant leur espèce) des lésions variables, sont communs à l'homme et aux animaux et siègent souvent en dehors du cuir chevelu.

On distingue deux types de tricophytons, les T. *endothrix* et les T. *ectothrix*. Les T. endothrix, comme l'indique leur nom, siègent exclusivement dans le cheveu et sont très rares dans les follicules ; ils possèdent toujours de grosses spores. Au contraire, les T. ectothrix pénètrent seulement dans la cuticule des cheveux, entourent ceux-ci sur toute la hauteur des follicules et se prolongent quelquefois sur le poil ; les spores peuvent offrir de faibles dimensions, auquel cas le diagnostic avec le microsporon Audouini devient un peu délicat.

Nous plaçant au point de vue de la *bactériologie clinique*, nous étudierons successivement les lésions du *cuir chevelu*, de la *barbe* et des *parties glabres*, occasionnées soit par les T. endothrix, soit par les T. ectothrix, puis nous dirons un mot de l'*inoculation* des tricophytons.

(A) TONDANTES TRICOPHYTIQUES

Tondantes dues aux tricophytons endothrix.

Un caractère, commun à toutes ces teignes, est la *fugacité de la circination épidermique*, qui précède la chute des poils. Quand les cheveux sont envahis, le cuir chevelu des plaques est généralement sain et propre. Le poil, cassé court, paraît plus gros et plus foncé que normalement. D'ordinaire il existe des *inoculations secondaires* aux parties glabres. De ces teignes, les unes sont dues à un *T. à mycélium fragile*, les autres à un *T. à mycélium résistant* (nous laisserons de côté d'autres types, rares, d'endothrix).

Tondante due au tricophyton à mycélium fragile.

C'est une *teigne peladoïde bénigne*, qui forme le *tiers des tondantes de l'enfance*. Les poils sont tous cassés au ras de la peau. La plaque, irrégulière, présente un certain nombre de cheveux sains et entiers. Cet aspect rappelle la pelade à cheveux fragiles. Au niveau des orifices pilaires, on observe des points noirs, qui correspondent à des racines incluses dans la couche cornée de l'épiderme et plus ou moins déviées. La marche de cette teigne est rapide. La guérison, centripète, s'opère en 3 à 6 mois.

Le cheveu se montre difficile à épiler, la racine étant très courte ; *au microscope*, on voit des spores rondes et un mycélium moniliforme, très fragile.

Les *cultures* peuvent être obtenues au bout de 15 à 18 jours. Sur pomme de terre, on observe une bande brune, recouverte d'une mince couche poudreuse. Sur gélose au moût de bière (au demi), c'est un monticule gris, avec incisures radiées ; la base du mamelon se couvre d'une poudre grisâtre. Sur moût

de bière liquide, se développent des touffes mycéliennes, tassées en une masse globuleuse jaunâtre. La culture sur gélose peptonée et maltosée apparaît deux fois plus abondante que sur tout autre milieu. Elle se présente sous forme d'un cône à sommet obtus, de couleur crème, nuancé de cercles gris, roses et ocreux.

Tondante due au tricophyton à mycélium résistant.

Les *signes cliniques* n'offrent *rien de caractéristique*. Les plaques sont généralement rondes et les cheveux paraissent très espacés. Courbes, virgulaires, ils ne sont pas tous cassés à la même hauteur. *Au microscope*, on trouve des spores carrées et un mycélium résistant, rubané.

Au bout de 15 à 18 jours, on voit apparaître, sur pomme de terre, une multitude d'étoiles très petites, jaunâtres, poudreuses, plus ou moins confluentes. Sur gélose au moût de bière (au demi), c'est un soleil de poudre jaune, au centre duquel se montre le plus souvent une élevure régulière. Sur gélose peptonée et maltosée, se développe une cupule de coloration crème à bords verticaux en dedans, inclinés au dehors ; tout autour de cette cupule existe une aréole poudreuse.

Tondantes dues aux tricophytons ectothrix.

Elles ont pour caractères communs d'être *rares* et *bénignes*.

(B) TRICOPHYTIES DE LA BARBE

On distingue la tricophytie *à dermite profonde*, la tricophytie *à dermite légère*, humide, disséminée et la tricophytie *sèche*.

Tricophytie à dermite profonde.

Elle comprend *plus de la moitié des tricophyties de*

la barbe. C'est le *sycosis* ou la *mentagre* vulgaires. On ne cherchera pas le parasite dans les poils morts, détachés de leur base, entiers, mais dans les poils follets, cassés, dont la partie radiculaire est revêtue de filaments sporulés. Ces poils se rencontrent d'ordinaire sur les bords de la lésion. Le parasite pourra être décelé également dans le pus des vésico-pustules non ouvertes ; on y verra parfois des débris mycéliens, difficiles à colorer.

Sur gélose au moût de bière (au demi), on obtient une culture blanche, ombiliquée au centre et entourée d'une aréole poudreuse, limitée par d'énormes rayons divergents. Sur le milieu d'épreuve, c'est un gâteau blanc, rond, à bords godronnés. Le parasite est identique au *T. ectothrix du cheval*. Il se montre pyogène ; les cultures d'un mois, en milieu peptoné à 7 pour 100, filtrées et inoculées au cobaye, lui donnent en effet une suppuration (amicrobienne).

Tricophytie à dermite légère, humide, disséminée.

Les lésions se trouvent disséminées par *petits placards*. Il n'existe *pas de folliculite*. Les poils malades sont plus nombreux que dans le sycosis ; ils apparaissent gros, grisâtres, très cassants à l'épilation. La culture du parasite (sur milieu d'épreuve) est jaune, craquelée, vermiculaire. *Le tricophyton* (ectothrix) *se rencontre aussi chez le cheval*.

Tricophytie sèche.

Caractérisée par la présence de poils cassés, situés au sommet de petits cônes épidermiques. Le parasite est disposé comme tous les *ectothrix*. La culture offre une couleur rose (sur milieu d'épreuve). MM. Verujski et Duclaux ont décrit, *chez le coq, un trycophyton identique*.

(C) TRICOPHYTIES DES PARTIES GLABRES

Il nous suffira de mentionner : 1° *Les tricophyties suppurées,* dues aux *ectothrix* pyogènes à cultures blanches. Elles forment *le tiers des tricophyties cutanées* et il en existe deux variétés : les périfolliculites agminées, dues au tricophyton du cheval, et l'herpès iris de Biett, dû au tricophyton du chat, très voisin de celui du cheval. 2° *Les tricophyties sèches serpigineuses, très rares,* à contour immense, à évolution indéfinie et qui rappellent le tokelau. 3° *Les tricophyties accessoires des teigneux, les plus rares,* dues aux T. endothrix et formant des placards toujours limités.

[*Le Kerion Celsi* n'est qu'une tricophytie suppurée du cuir chevelu, due au T. ectothrix du cheval. — *Les onychomycoses tricophytiques* sont rares et semblent dues à des T. ectothrix.]

(D) INOCULATION DES TRICOPHYTONS

Inoculation à l'homme.

On réussit difficilement chez les gens à sueur acide, assez facilement chez les gens à sueur alcaline, ou rendue alcaline par ingestion de bicarbonate de soude. On réussit mieux avec les squames ou les poils, qu'avec les cultures. Un procédé, qui donne presque toujours des résultats positifs, consiste à pratiquer l'inoculation dans la vésicule produite par une allumette en ignition. Après 4 à 5 jours, apparaît une aréole rose, qui s'étend et forme un cercle tricophytique type. Le T. du cheval s'inocule sans précautions spéciales, mais les lésions anthracoïdes qu'il détermine ne permettent d'entreprendre les expériences qu'avec une grande circonspection.

Inoculation aux animaux.

Les T. endothrix s'inoculent facilement, dans les vésicules, au cobaye, au lapin et au chat ; les lésions guérissent en 5-6 semaines. Les T. ectothrix s'inoculent sans précautions spéciales et engendrent des lésions serpigineuses de durée indéfinie. Mais (au moins chez le cobaye) ils ne se montrent pas pyogènes. En dehors de l'ectothrix du cheval, les tricophytons déterminent chez les animaux des lésions épidermiques, mais très peu d'altérations pilaires. Ajoutons que M. Sabrazès aurait obtenu, chez le lapin, une pneumonie tricophytique, par injection intra veineuse.

III. *Tondante spéciale de Grüby.*

Elle représente, *en France*, *plus de la moitié des teignes de l'enfance* et les comprend presque toutes en Angleterre. Par contre, elle paraît inconnue en Italie. Elle ne *débute* point par l'épiderme, mais *par le poil.* Au niveau des plaques, chaque cheveu apparaît revêtu, à sa base et sur 3 millimètres de hauteur environ, d'une *gaine blanc grisâtre,* formée par le parasite. Les poils cassent à des niveaux différents ; la gaine se trouve alors dissociée et la plaque se recouvre de débris squameux, qui feraient croire à distance qu'on a répandu de la cendre sur la tête. Les cheveux deviennent ternes et décolorés. Ils sont faciles à enlever en masse, mais, quand on procède ainsi, on n'arrache qu'un fragment de la racine. Ce fragment, d'apparence crayeuse, possède un diamètre double de celui de la portion aérienne. *Jamais on ne rencontre le microsporon* Audouini *en dehors du cuir chevelu.* Il y détermine une *maladie tenace*, rebelle au traitement et très contagieuse ; toutefois, elle guérit constamment à la longue, sans amener d'alopécie. Ajoutons que la

teigne tondante de Grüby se voit *rarement passé 8 ans.*

Si on examine un cheveu malade, après l'avoir chauffé légèrement dans la potasse, sa surface apparaît recouverte d'une *mosaïque de petites spores*, irrégulièrement juxtaposées. Ces spores forment une gaine continue autour du cheveu et ne pénètrent pas dans sa substance. On peut se rendre compte aisément, par l'étude histologique, que la croissance du parasite s'effectue de la portion aérienne du poil vers la partie radiculaire. Caractère essentiel, le m. Audouini présente, dans le cheveu malade, un *mycélium* facile à reconnaître, bien que peu développé. Pour l'observer, on enlèvera un poil entier, sur les bords d'une plaque en voie de guérison, on le traitera à froid par la potasse et on frottera légèrement la lamelle contre la lame, afin d'éliminer la gaine parasitaire. On reprendra le cheveu, on le portera sur une autre lame avec un peu de potasse et, après avoir chauffé légèrement, on écrasera le poil, dans l'intérieur duquel apparaîtra le réseau mycélien pathognomonique du m. Audouini.

La *culture* du microbe de Grüby *est facile*. Le plus souvent, on l'obtient pure d'emblée, sans bactéries ni moisissures. Sur pomme de terre, se développe, au bout de 7 à 8 jours, une traînée d'abord grisâtre, puis brun rougeâtre. Après 10 à 12 jours, elle est recouverte d'un duvet rare et court. La culture est encore vivante passé 3 mois, tandis que les cultures de tricophytons meurent en 3 semaines. Sur moût de bière gélosé, on observe, au bout de 3-4 jours, une touffe radiée, pénétrant dans le milieu nutritif; un peu plus tard, apparaît un duvet aérien. Il se forme ensuite, autour de la culture primitive, des cercles concentriques, d'abord glabres, puis duveteux.

Les *inoculations* du microsporon Audouini ont toujours fourni, chez les animaux, des résultats négatifs.

PITYRIASIS VERSICOLOR

Le *microsporon furfur* en représente, comme on le sait, l'agent pathogène. Il a été découvert par Eichstedt, dénommé par Robin, et étudié très complètement, en 1892, par M. Kotliar. Cet auteur le considère comme un oïdium, très voisin de l'oïdium lactis.

Pour le rechercher, il suffit de détacher des squames épidermiques, au niveau d'une plaque de pityriasis. Ces squames sont déposées sur une lame, on les traite par la potasse (à 40 pour 100) et on recouvre d'une lamelle. Le parasite apparaît alors, constitué par des *filaments mycéliens* et par de nombreuses *spores*.

Le microsporon furfur *peut se cultiver*, en ensemençant les squames dans de la gélose glycérinée à 5 pour 100, que l'on coule en boîtes de Petri. On obtient ainsi une culture jaune clair, plissée, très caractéristique. La réussite n'est cependant pas fatale. Les colonies sont repiquables en bouillon glycériné (acide ou alcalin) et sur pomme de terre. L'optimum thermique de croissance correspond à 36°.

Le microsporon furfur se montre *inoculable* au lapin. On rase la peau de l'animal ; on la frotte avec une culture et on la protège à l'aide d'un pansement approprié. Après 8 jours, on voit se développer des taches jaunâtres, saillantes, dans lesquelles on retrouve le parasite.

ASPERGILLOSES CUTANÉES (CARATÉS. — TOKELAU)

Caratés. — On donne ce nom à un groupe d'affections, assez répandues en Colombie et caractérisées par une *épidermite desquamative* et par du *pseudo-vitiligo*. Les lésions siègent surtout aux parties découvertes, mais sont susceptibles de généralisation. Il s'agit de *maladies chroniques*, dont la durée peut atteindre 40 ans et que l'on considère comme incurables. On en décrit *4 types cliniques*, correspondant à 4 couleurs différentes : noir, violet, bleu et rouge. Les caratés ont été étudiées, au point de vue bactériologique, par M. Montoya, sous la direction de M. Sabouraud. Dans les squames, on rencontre un mycélium et des fructifications parfaitement reconnaissables. Il a été possible d'isoler, par la culture, *4 espèces d'aspergillus*. Ces parasites sont inoculables au lapin. On les aurait rencontrés dans les eaux des mines d'or et dans le corps de certains insectes.

Tokelau. — Dermatose parasitaire, très répandue en Océanie. C'est la *teigne imbriquée* de M. Patrick Manson, dont l'aspect est tout à fait caractéristique. Elle est due au « *lepidophyton* », aspergillus qui fructifie rarement sur la peau (Tribondeau). Son étude mycologique semble encore peu avancée.

PALUDISME

I. *Principaux caractères de l'hèmatozoaire du paludisme.*

L'hématozoaire du paludisme, ou *hemamœba malariæ* (Laveran), peut se présenter, *dans le sang circulant*, sous la forme de corps sphériques, de corps en croissant ou de corps en rosace et, *dans le sang extrait de l'organisme*, sous la forme de corps flagellés (fig. 172-173).

Corps sphériques. — Les corps sphériques constituent la variété la plus fréquemment observée. Ils

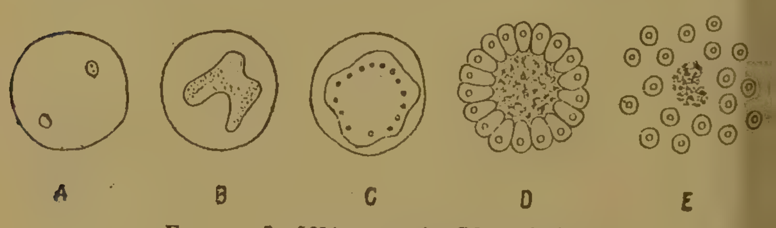


Fig. 172. — Hématozoaires du paludisme.
A. B. C. Corps sphériques à divers degrés de développement. — D. E. Reproduction endogène du parasite malarique.

sont animés de mouvements amiboïdes et constitués par une substance transparente et incolore. Leur diamètre varie d'1 μ à celui d'une hématie. Les plus petits ne contiennent pas de pigment, ou n'en possèdent qu'un à deux grains. A mesure qu'ils se développent, le nombre de ces grains augmente. Ils sont noirs, disposés soit irrégulièrement, soit en couronne et offrent un mouvement brownien très vif. Les corps sphériques apparaissent libres ou accolés aux hématies. Ils seraient même parfois situés à l'intérieur de celles-ci

(Metchnikoff). Il n'est pas rare de voir deux ou plusieurs parasites sur un même globule. A mesure qu'ils croissent, les hématies-hôtes pâlissent, puis disparaissent. Les corps sphériques possèdent un noyau, entouré d'une aréole claire, qui est bien mis en évidence par la méthode de M. Laveran.

Corps en croissant. — Ils sont transparents, incolores et généralement libres. Leurs extrémités se montrent pointues ou arrondies. Au centre, siège le noyau ; il s'y trouve aussi un amas de grains de pigment. La longueur dépasse un peu le diamètre des hématies, la largeur est de 2 à 3 μ ; on n'observe

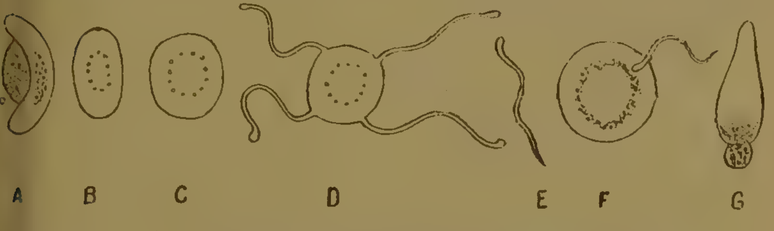


Fig. 173. — Hématozoaires du paludisme.

A. B. C. Transformation des corps en croissant en corps sphériques. — D. Corps flagellé. — E. Flagelle libre. — F. Fécondation du macrogamète. — G. Zygote.

jamais de corps en croissant de plus petite taille. Cette forme existe surtout dans le sang des malades atteints de cachexie palustre ou de fièvre de récidive. On peut voir parfois les croissants se transformer en corps sphériques.

Corps en rosace. — Ils se présentent, tout d'abord, sous la forme d'un corps sphérique à bords dentelés, dont le pigment s'est réuni au centre. Les dentelures deviennent ensuite de plus en plus profondes et on a alors l'aspect d'une marguerite. Enfin, les segments s'arrondissent et se séparent les uns des autres, d'où production d'une série de petits corps sphériques libres, chacun muni d'un noyau. Les corps en rosace

sont rares ; on les observe principalement au cours des rechutes et pendant la première période des accès. Le nombre des segments varie habituellement de 6 à 12 ; parfois ils sont encore plus abondants et disposés en *morula*.

Corps flagellés. — On ne les rencontre que dans le sang extrait de l'organisme depuis quelques minutes. Les flagelles, au nombre de 1 à 4, sont insérés, symétriquement ou non, sur le parasite, qui offre l'aspect d'un corps sphérique. Leur extrémité est renflée. Leurs mouvements restent individuels, indépendants les uns des autres. A l'état de repos, ils sont presque impossibles à voir. Si on les observe attentivement, on note qu'ils ne tardent pas à devenir libres.

Les corps flagellés représentent des éléments mâles (*ubi infra*). Les corps en rosace constituent des figures de reproduction endogène, seul mode de multiplication du parasite dans l'organisme humain.

Au point de vue de la fréquence relative des diverses formes, M. Laveran, en Algérie, a trouvé, sur 432 malades, porteurs d'hématozoaires :

Corps sphériques seuls.	266 fois
Corps en croissant seuls..	43 —
Corps sphériques et corps en croissants	31 —
Corps flagellés.	59 —
Corps sphériques, corps en croissants et corps flagellés.	33 —

L'hématozoaire du paludisme *ne peut être cultivé.* Les *inoculations,* tentées chez un grand nombre d'animaux, chez le singe en particulier, ont toujours échoué. Par contre, divers auteurs ont (après MM. Mariotti et Ciarocchi) pratiqué avec succès l'inoculation à l'homme. Récemment encore, M. Ziemann, chez des nègres du Cameroun, obtenait 71,42 pour 100 de succès. La maladie éclate après une incubation de 8 à 12 jours. L'injection dans les veines paraît seule capable de réussite.

On sait qu'il existe 3 types de fièvre palustre : la *fièvre tierce* (second accès le 3e jour), la *fièvre quarte* (second accès le 4e jour) et la *fièvre estivo-automnale* (irrégulière). Les auteurs italiens admettent que chaque type de fièvre possède un parasite spécial. La fièvre estivo-automnale reconnaîtrait pour agent la *laverania precox,* que nous prendrons tout à l'heure comme exemple, en étudiant l'évolution du parasite malarique et qui possède des gamétocytes en croissant. Les autres types seraient dus à des *plasmodiums,* caractérisés par des gamétocytes sphériques ; celui de la fièvre quarte montrerait des formes de multiplication endogène en rosace, celui de la fièvre tierce des formes en morula. M. Laveran n'admet qu'un seul hématozoaire, avec de simples variétés.

II. *Propagation de la malaria.*

L'hemamœba malariæ ne se reproduit dans l'organisme humain que par multiplication endogène. D'autre part, le paludisme n'est pas directement contagieux. Ces deux données, solidement établies, s'expliquent très bien par la présence d'un « hôte intermédiaire », le *moustique.* L'hypothèse de la transmission par les moustiques, que M. Laveran avait jadis émise (à la suite des travaux de M. Manson sur la filariose), s'est trouvée vérifiée, grâce aux expériences de M. Ross sur les hématozoaires des oiseaux et aux recherches de MM. Grassi, Bignami, Bastianelli, Manson, etc..., sur le parasite malarique lui-même.

Nous résumerons rapidement ces derniers travaux, qui ont conduit à une prophylaxie rationnelle du paludisme. A l'aide de preuves histologiques, M. Grassi a montré que, parmi les moustiques, les *anopheles* seuls pouvaient jouer le rôle d'hôte intermédiaire.

D'autre part, MM. Bignami et Bastianelli ont reproduit la malaria chez l'homme, par piqûre d'anopheles pris dans la chambre d'un paludique et M. Manson a transmis, en Angleterre, le paludisme à son fils, par piqûre d'anopheles provenant de la Campagne Romaine.

Voici comment évolue l'hemamœba malariæ dans le corps des anopheles. Une femelle pique un malade (atteint de fièvre estivo-automnale, par exemple) et en absorbe le sang. Ce sang contient des corps sphériques et des croissants. Les premiers sont détruits par les sucs digestifs, les seconds persistent et deviennent ovoïdes. Ce sont les *gamétocytes,* dont on distingue deux types : mâle (plus petit, à pigment disséminé) et femelle (plus volumineux, à pigment généralement central). Les *microgamètes* (mâles), se transforment en corps flagellés et les flagelles, devenus libres, vont féconder les *macrogamètes* (femelles). L'œuf fécondé, ou *zygote,* s'allonge, prend un aspect fusiforme et pénètre dans la paroi gastrique, où il s'enkyste (fig. 174). A l'intérieur du kyste, apparaissent de nombreux noyaux, qui donnent naissance à des corps arrondis, lesquels se divisent et engendrent des corps fusiformes ou *sporozoïtes.* Ceux-ci, rendus libres par la rupture de la cellule-mère, s'échappent et vont se localiser dans les glandes venimo-salivaires (fig. 175). Le moustique, en piquant un individu, lui inocule donc des sporozoïtes ; ces sporozoïtes se convertissent



Fig. 174. — Zygotes mûrs, à la surface d'un estomac de moustique.

en corps sphériques dans l'organisme humain. Les



Fig. 175. — A. B. Zygotes en voie d'évolution. — C. Zygote mûr. — D. Sporozoïtes. — E. Coupe d'une glande venimo-salivaire avec sporozoïtes dans les cellules.

sporozoïtes ne se développent pas à 14°-15° ; à 20°-22° ils n'apparaissent qu'en 7 jours ; d'où l'influence des climats et des saisons sur la propagation du paludisme.

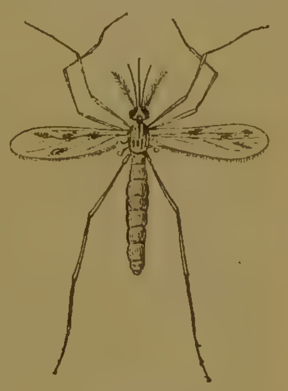


Fig. 176. — Anopheles claviger (femelle)

Parmi les anopheles, c'est surtout l'*A. claviger* (ou maculipennis) qui sert d'hôte au parasite malarique (fig. 176). On distingue aisément les femelles d'anopheles des femelles de *culex*, en ce que, chez les premières, les palpes atteignent la même longueur que la trompe (fig. 177). Les anopheles ne s'élèvent jamais beau-



Fig. 177. — Têtes de Culex. Têtes d'anopheles.

coup au-dessus du sol. Ils pénètrent le soir dans les maisons ; le jour, ils se réfugient dans les endroits obscurs ou sur les arbres touffus. Ils ne sont guère transportés au loin par les vents. Ils déposent leurs œufs sur les eaux stagnantes ou à faible courant. Leurs larves restent horizontales à la surface de l'eau, au lieu d'être inclinées à 45° comme celles des culex (fig. 178).

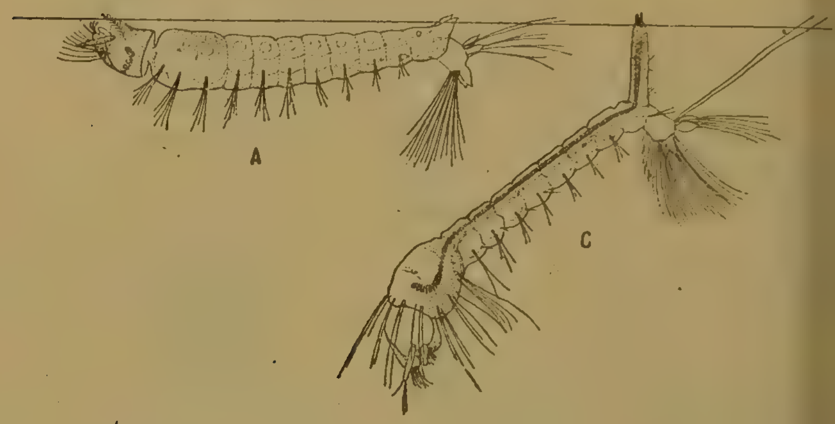


Fig. 178. — Position des larves d'anopheles et de culex, à la surface de l'eau.

III. *Prophylaxie du paludisme.*

Indispensable à bien connaître pour les bactériologues. Elle se déduit aisément de ce qui précède et peut être ainsi résumée : 1° détruire les moustiques, ou bien se protéger contre leurs piqûres ; 2° traiter les malades, pour éviter l'infection des moustiques.

Assainissement des localités palustres. — Faire disparaître les eaux stagnantes, ou leur substituer les eaux courantes. Empêcher leur formation à nouveau. Dessécher les marais salants non utilisés. Cultiver les eucalyptus et les pins dans les localités palustres, mais ne pas entourer les maisons de bosquets ou de bois

ombreux. Dans les pièces d'eau de quelque étendue, entretenir des poissons en nombre suffisant; sur les petites flaques, verser un mélange d'huile de pétrole et de goudron (pour asphyxier les larves d'anophèles), à raison de 10 centimètres cubes par mètre carré, tous les 15 jours, du printemps jusqu'aux premiers froids. Couvrir les citernes et les réservoirs, ou verser de l'huile à leur surface.

Prophylaxie individuelle. — Ne voyager, si possible, que pendant la saison salubre (qui varie avec chaque pays). Habiter en ville un quartier salubre, c'est-à-dire central ou élevé ; et, à la campagne, une maison construite sur une colline et non entourée de jardins. Vider les réservoirs d'eau qui ne sont pas indispensables. Détruire les larves de moustiques. Faire un usage systématique du moustiquaire (bien choisir celui-ci et veiller à son bon état). Fermer le soir les fenêtres de la chambre à coucher. Ne pas sortir, si possible, avant le lever et après le coucher du soleil. Quand on doit passer la nuit en plein air, allumer de grands feux, porter des gants et des bas et envelopper la tête de gaze. Prendre préventivement, lorsqu'on ne peut réaliser les conditions prophylactiques indiquées, $0^{gr},20$ de sulfate de quinine tous les jours, ou $0^{gr},40$ tous les deux jours.

Traiter les malades pendant 2 mois au moins, après cessation des accès et garnir leurs lits de moustiquaires.

IV. *Examen du sang paludique.*

Le sang doit toujours être prélevé un peu avant les accès, ou au début de ceux-ci. En voici la preuve. Sur 79 examens, pratiqués peu de temps avant les accès, M. Laveran a observé 79 fois le parasite. Sur 286 examens, pratiqués pendant les accès, il a trouvé l'héma-

tozoaire 273 fois. Enfin, sur 164 examens, faits quelques heures après les accès, il a rencontré le parasite 141 fois. Dans l'intervalle des accès, l'hématozoaire disparaît du système circulatoire et se réfugie dans la rate où, étant données la congestion et la friabilité de l'organe chez les malariques, il serait imprudent d'aller le chercher. Toutefois, certains cachectiques présentent des parasites dans le sang, en pleine apyrexie.

L'examen peut porter sur du sang frais ou sur du sang desséché, puis coloré.

1° *Examen à l'état frais.* — Il se fera entre lame et lamelle. L'emploi de la platine chauffante sera indiqué, dans nos climats, pour l'étude des flagella et des mouvements amiboïdes. Les corps sphériques et les corps en croissant se voient parfaitement sur les préparations à l'état frais ; beaucoup d'auteurs préfèrent même celles-ci aux préparations colorées.

2° *Examen après coloration.* — Les lames seront teintées soit, simplement, à la thionine, au bleu de méthylène ou mieux au bleu polychromatique, soit à l'aide des méthodes éosine-thionine ou éosine-bleu de méthylène. On mettra en évidence les noyaux des hématozoaires par le procédé de M. Laveran.

MALADIES PROPRES AUX ANIMAUX

PASTEURELLOSES. — HOG-CHOLÉRA

I. *Pasteurelloses.*

On désigne sous ce nom diverses affections des animaux, dues à des bactéries fort voisines. A ces bactéries, MM. Toni et Trevisan ont donné le nom générique de *pasteurella*. Ils voulaient ainsi rappeler les célèbres travaux de Pasteur sur le microbe du choléra des poules, le premier en date des organismes de ce groupe important. Revisant et étendant les recherches de M. Hüppe et de MM. Nocard et Leclainche sur les « septicémies hémorragiques », M. Lignières a apporté de nombreuses contributions à l'étude de cet ensemble de maladies qu'il dénomme « pasteurelloses ». Nous nous inspirerons de ses travaux et nous décrirons successivement les caractères généraux des pasteurellæ, le diagnostic bactériologique des pasteurelloses et la vaccination de ces affections.

Caractères généraux des pasteurellæ.

Ce sont des *cocco-bacilles* immobiles, *très polymorphes* et ne formant pas des spores. Ils ne prennent

pas le Gram ; traités par les matières colorantes qui ne surcolorent pas (série thionique), ils affectent souvent un *aspect en navette*, dû à ce que la partie centrale ne se teinte point (fig. 179). On les nomme encore, pour rappeler les caractères qui précèdent, bactéries ovoïdes, bactéries en navette, bactéries à espace clair, bactéries bipolaires ; il est bon de connaître cette synonymie.

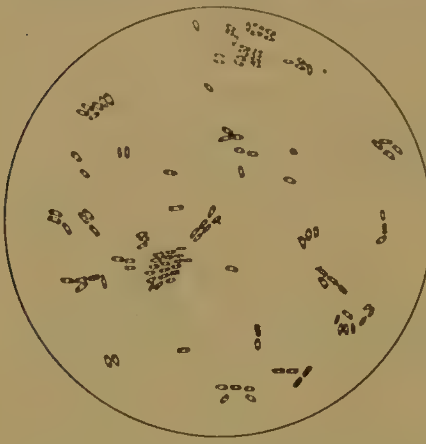


Fig. 179. — Pasteurella.

Ces organismes poussent sur les milieux ordinaires, à l'exception de la pomme de terre. Leurs *cultures* n'offrent absolument rien de caractéristique. Le bouillon se trouble ; sur gélose, on observe un dépôt blanc, moyennement abondant ; dans la gélatine, par piqûre, c'est une traînée de grains, parfois confluents. Les cultures sur gélose adhèrent, dans certains cas, assez intimement au milieu (Lignières). Les pasteurellæ ne croissent abondamment que dans les milieux-sérum. Elles ne liquéfient pas la gélatine, ne coagulent pas le lait, ne produisent jamais d'indol et dégagent une odeur spéciale. Enfin elles se montrent surtout aérobies.

Leur *virulence* est souvent marquée et multiple. Quand on les inocule dans les veines, ils offrent une certaine tendance à se localiser au niveau des synoviales tendineuses et articulaires.

Les *pasteurelloses*, naturelles ou expérimentales, présentent trois formes : suraiguë (septicémique), aiguë (avec déterminations variées) et chronique. Dans

cette dernière forme, l'agent pathogène peut être très difficile ou même impossible à déceler.

Les pasteurellæ jouent assez fréquemment un *rôle préparatoire* et disparaissent devant un organisme d'infection secondaire, d'où nombre d'erreurs de diagnostic et d'interprétation nosologique.

Notons enfin qu'un même type de bactérie ovoïde peut infecter plusieurs espèces animales *dans les conditions naturelles.*

Diagnostic bactériologique des pasteurelloses.

Pasteurellose aviaire (Choléra des poules).

Le bactérium pathogène (fig. 180) est des plus polymorphes; il pousse avec une extrême rapidité dans les divers milieux; les cultures sont très faciles à obtenir et se montrent surtout riches en présence de sérosités. Les milieux-sérum sont presque indispensables pour obtenir un développement anaérobie.

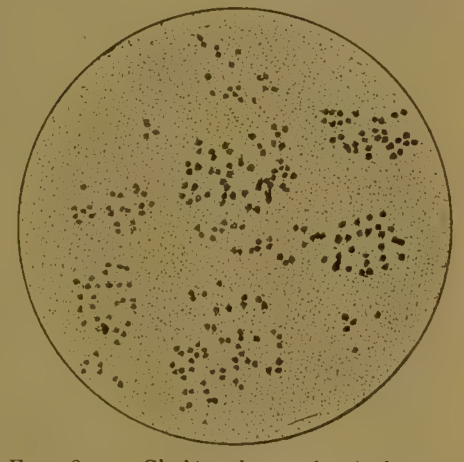


Fig. 180. — Choléra des poules (culture en bouillon). D'après Thoinot.

Inoculée dans le pectoral de la poule, la pasteurella amène d'ordinaire la mort en moins de 24 heures, avec tous les signes de la maladie naturelle : abattement, accès de somnolence, attitude en boule; crête violacée; diarrhée grisâtre, puis sanglante, mousseuse, mêlée de masses blanches; écoulement de mucus par le bec. A l'autopsie, on trouve, au point inoculé, une

nécrose des fibres musculaires (un simple œdème, si la mort a été très rapide), — on remarque, de plus, diverses *lésions* caractéristiques *des septicémies hémorragiques* : congestion des viscères, taches ecchymotiques sur les séreuses et épanchements rosés dans leurs cavités, tuméfaction du foie et de la rate, sang « dissous », — on note, enfin, une violente inflammation de l'intestin, lequel est rempli d'un liquide diarrhéique abondant. On réussit aussi à contaminer la poule par ingestion. Le pigeon est très sensible à l'infection, les petits oiseaux encore davantage. Le lapin succombe, en quelques heures, à l'inoculation d'une trace de virus ; les lésions sont identiques à celles qu'on rencontre chez les oiseaux ; on observe aussi, très fréquemment, une double pleurésie. L'ingestion donne des résultats encore plus constants que chez la poule ; c'est sur ce fait que Pasteur a basé sa méthode de destruction des lapins, appliquée avec succès en Champagne et en Australie. La souris est facile à infecter. Le cobaye, inoculé sous la peau, présente un abcès local d'allures bénignes, mais d'évolution assez traînante, dans le pus duquel la bactérie ovoïde se conserve très longtemps vivante et virulente. Les grands animaux ne succombent que si on leur inocule, dans les veines, un virus très actif (Lignières).

On doit confondre avec le choléra des poules un *certain nombre d'affections* observées, soit chez ces animaux, soit chez divers *oiseaux de basse-cour ou d'agrément*. Leur énumération n'offrirait aucun intérêt. Par contre, on a souvent décrit comme pasteurellose aviaire des maladies dues à des organismes bien différents de la bactérie ovoïde ; en présence d'une épidémie ressemblant au choléra des poules, on aura donc bien soin d'étudier les caractères du microbe isolé et de les comparer à ceux que nous avons indiqués. On n'oubliera pas toutefois que la poule peut, dans

des circonstances, assez rares il est vrai, contracter une pasteurellose non aviaire, par exemple la pasteurellose porcine.

Septicémie des lapins.

Nous la connaissons déjà. On n'a pas oublié que, d'après M. Lignières, *les lapins n'ont pas de pasteurellose propre.* Les bactéries isolées se rapportent rarement au type aviaire, le plus souvent aux types ovin ou porcin.

Pasteurellose canine (Maladie des chiens).

Nous rappellerons qu'elle prend surtout les races perfectionnées et les jeunes animaux, qu'elle affecte les formes les plus variées (éruptive, abdominale, thoracique) et se traduit par des lésions non moins diverses (digestives, respiratoires, nerveuses). On ne réussit qu'exceptionnellement à transmettre la maladie par le jetage, la sérosité pulmonaire et le sang ; le moyen le moins infidèle consiste dans le badigeonnage de la muqueuse pituitaire des jeunes animaux, avec le jetage suspect. Les pustules ne se sont jamais montrées virulentes.

M. Lignières a isolé (la recherche est particulièrement difficile) de l'organisme des chiens malades une *espèce spéciale de pasteurella.* Elle se présente sous la forme de bacilles, assez longs il est vrai, mais reprenant le type classique de la bactérie ovoïde après passage par le péritoine du cobaye. Les pasteurellæ, récemment isolées, poussent dans le bouillon en se localisant au fond du tube ; mais, après plusieurs repiquages, elles troublent uniformément le milieu. Elles ne se développent à l'abri de l'air que si on fait usage de bouillon-sérum. Elles croissent facilement sur le sérum coagulé, qui convient mieux que la gélose à leur recherche. Notons enfin que l'optimum thermique

oscille entre 18° et 20°, ce qui constitue un caractère différentiel important avec les autres bactéries ovoïdes.

Le microbe de la maladie des chiens tue le cobaye et la souris dans le péritoine ; le lapin sous la peau, si la virulence est suffisante ; les autres animaux, si cette virulence a été fortement exaltée. L'inoculation sous la peau du chien produit un œdème, suivi ou non de suppuration ; les jeunes sujets peuvent succomber : on retrouve alors la bactérie dans les lésions locales, tandis que, dans le sang, on rencontre divers organismes d'infection secondaire. L'inoculation intraveineuse permet de reproduire les différents types anatomo-cliniques de la pasteurellose canine, mais le microbe pathogène ne peut être isolé que pendant la première semaine de la maladie expérimentale.

La pasteurella existe *normalement* dans les fosses nasales et la bouche des chiens, sous une forme peu virulente. Nous avons dit ailleurs qu'elle est identique à celle de la septicémie des cobayes de M. Phisalix.

(La *maladie des chats* doit être confondue, bactériologiquement, avec celle des chiens.)

Pasteurellose équine.

Affection *protéiforme*, d'où la multiplicité des noms qui lui ont été donnés. Septicémique, c'est la « fièvre typhoïde » ou l' « influenza » du cheval — aiguë ou subaiguë, c'est, suivant ses localisations, la « pneumonie contagieuse » ou la « pneumo-entérite » — chronique enfin, elle répond à certaines anémies pernicieuses progressives.

M. Lignières a montré quel rôle considérable, bien que secondaire chronologiquement, joue le streptocoque de Schütz (streptocoque gourmeux) dans la pasteurellose équine en général et plus spécialement dans la pneumonie contagieuse. On aura donc toujours présente à l'esprit la possibilité de rencontrer *exclusi-*

vement dans les lésions le streptocoque de la gourme, devant lequel disparaît souvent la bactérie ovoïde, cause première de la maladie. L'expérimentation montre, de son côté, qu'en inoculant la pasteurella on peut ne « récolter » que le microbe de Schütz. En présence de ces faits, on est en droit de se demander si nombre de manifestations, décrites comme gourmeuses, ne sont pas tout simplement des infections secondaires, consécutives à une pasteurellose méconnue et d'ailleurs fréquemment méconnaissable.

La *bactérie* pathogène est *difficile à isoler*. La meilleure méthode consiste à inoculer les produits suspects dans le péritoine du cobaye ; mais, répétons-le encore une fois, il ne faut pas s'étonner si, lors de l'autopsie, on ne retrouve que des streptocoques.

La pasteurella pousse un peu dans le vide. Elle tue le cobaye, le lapin et la souris sous la peau ; le cheval, le chien et la poule dans les veines. L'inoculation sous-cutanée est parfois mortelle pour le mouton, l'âne et le cheval. L'inoculation intraveineuse permet de reproduire, chez le cheval, toutes les formes de la maladie naturelle. Enfin, le bœuf et le rat sont réfractaires.

Le microbe se rencontre *normalement*, mais sous forme peu virulente, dans les fosses nasales et la bouche des chevaux.

Pasteurellose bovine.

Protéiforme également. On doit y faire rentrer la Wild et la Rinderseuche de M. Bollinger, le barbone des buffles (Oreste et Armanni) et diverses formes rencontrées par M. Lignières dans l'Argentine.

Ces *dernières formes* sont tantôt aiguës (entérite, dite « entéqué », pneumonie, septicémie sans lésions spéciales), tantôt chroniques (entérite chronique, avec arthrites et artérites déformantes). Elles ne sont cer-

tainement pas propres à l'Argentine et on les retrouvera ailleurs lorsqu'on voudra les chercher soigneusement; c'est ce qui nous a engagé à les mentionner. Elles sont dues à une pasteurella, qu'on ne peut déceler que dans les formes aiguës. Cette pasteurella, quelquefois difficile à isoler, pousse mal à l'abri de l'air. Elle tue, sous la peau, le lapin, le cobaye et la souris et, dans les veines, les autres animaux. On reproduit la maladie lente, en injectant au bœuf des vieilles cultures, par la voie intraveineuse.

La *maladie de Bollinger* est tantôt septicémique, tantôt aiguë (offrant alors, soit la forme œdémateuse avec des tumeurs qui siègent le plus souvent au cou, soit la forme thoracique), tantôt enfin chronique (simulant d'abord la péripneumonie, puis la pneumonie caséeuse). Elle est due à une pasteurella, encore insuffisamment décrite.

Le *barbone* se caractérise, lui aussi, par des œdèmes et des manifestations pulmonaires. Il reconnaît pour cause une bactérie ovoïde, susceptible de tuer, sous la peau, le lapin, le rat, la souris, le poulet, le porcelet, la génisse et le buffle. La poule et le pigeon sont moins sensibles.

(*Certaines pleuro-pneumonies des veaux* doivent figurer parmi la pasteurellose bovine — Lignières).

Pasteurellose ovine.

Représentée, à l'heure actuelle, par la pneumo-entérite de M. Galtier et les formes de l'Argentine de M. Lignières. La *maladie de Galtier* est tantôt aiguë, tantôt chronique. Les *types décrits par M. Lignières* (et qui ne sont certainement pas propres à l'Amérique du Sud) se traduisent par des manifestations, tantôt aiguës (fièvre, souvent accompagnée de diarrhée), tantôt subaiguës (pneumo-entérite), tantôt enfin chroniques. Ce dernier type, la « lombriz » des Ar-

gentins, représente une cachexie aqueuse, attribuée jadis aux vers, que l'on rencontre, souvent dans la caillette, moins fréquemment dans l'intestin. M. Lignières a montré que les vers (qui d'ailleurs peuvent faire complètement défaut) ne jouaient qu'un rôle prédisposant. La pasteurella se rencontre régulièrement dans les formes aiguës, quelquefois dans les formes subaiguës, rarement dans les formes lentes. Les premières cultures sont toujours difficiles à obtenir. La bactérie tue, sous la peau, le lapin, la souris, le cobaye, le chien, ainsi que le mouton jeune ou affaibli. L'ingestion reproduit la maladie naturelle, chez le mouton. Ajoutons que l'organisme pathogène se trouve parfois dans les fosses nasales et la bouche des moutons *sains*.

Pasteurellose caprine (Pneumonie des chèvres).

Rencontrée dans divers pays, notamment en Turquie, où l'un de nous l'a étudié avec le Dr Réfik-bey. Aiguë ou chronique, elle est due à une bactérie ovoïde,

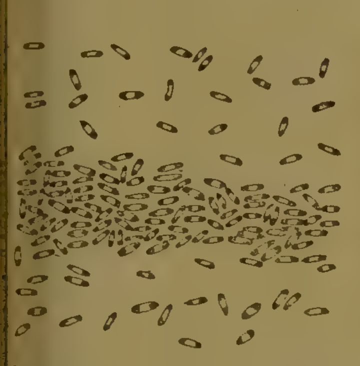


Fig. 181. — Pasteurella caprine (culture jeune sur gélose).

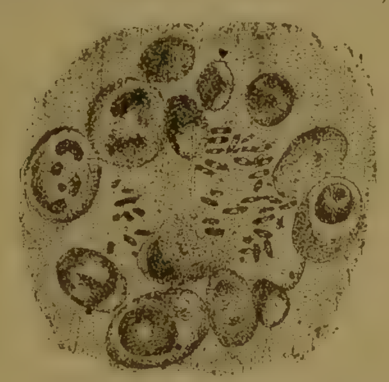


Fig. 182. — Pasteurella caprine (frottis de poumon hépatisé).

facile à isoler des lésions pulmonaires et du jetage et offrant les caractères classiques du genre pasteurella (fig. 181-182). Dans les coupes de poumon, on la retrouve sous forme d'amas, comme le bacille d'Eberth

dans la rate des typhiques. Elle tue la souris, le pigeon et le lapin sous la peau, le cobaye dans le péritoine, le veau, le chien et la chèvre dans le poumon (lorsque le virus est assez actif). Par inoculation sous-cutanée, elle fait périr la chèvre à la longue, avec des paralysies identiques à celles de la maladie naturelle.

Pasteurellose porcine (Pneumonie contagieuse).

En dehors du rouget, les porcs sont sujets à deux grandes affections : la *pasteurellose porcine* et le *hog-choléra*. La plus grande confusion a régné au sujet de ces maladies jusqu'aux travaux de M. Karlinski et de M. Lignières. *Cliniquement,* elles sont impossibles à différencier dans leurs types septicémiques et le diagnostic reste parfois très difficile dans les autres formes ; *anatomiquement,* l'absence de lésions ulcéreuses et nécrotiques de la muqueuse intestinale permettra d'éliminer le hog-choléra, mais la présence de lésions pulmonaires n'impliquera pas forcément l'existence de la pasteurellose. Ce qui contribue à rendre le problème particulièrement ardu, c'est que *les deux infections peuvent coexister* ; M. Karlinski a d'ailleurs reproduit la maladie mixte, par l'inoculation sous-cutanée ou l'ingestion des deux virus.

Le bactérium de la pneumonie contagieuse s'isole sans peine, même dans les cas à marche lente. C'est une *pasteurella typique* et très vivace, qui pousse mieux que les autres à l'abri de l'air. Sa virulence varie beaucoup, mais s'exalte facilement. On tue, sous la peau, la souris, le jeune cobaye et le lapin (si le virus est actif) ; dans le péritoine, le rat et le cobaye adulte ; dans les veines, la poule, le pigeon, le chien, le chat, le mouton, le bœuf et parfois le cheval et l'âne. Le porc peut succomber à l'inoculation sous-cutanée d'un virus très virulent ; on trouve alors, à l'autopsie, un œdème local hémorragique, un double

épanchement pleural, des foyers broncho-pneumoniques, quelquefois caséeux et même excavés (pseudo-tuberculose), de la tuméfaction des ganglions bronchiques et de la rate ; l'intestin reste indemne, ou simplement congestionné. L'inoculation dans les veines reproduit toutes les formes de la maladie, y compris le type articulaire. Enfin, l'ingestion a toujours donné des résultats négatifs.

Vaccination des pasteurelloses.

Pasteurellose aviaire. — On se sert des *vaccins pastoriens*, dont nous avons indiqué la préparation. Les poules sont inoculées à l'extrémité d'un aileron avec le premier vaccin et, douze jours plus tard, à l'extrémité de l'autre aileron avec le second vaccin. L'immunité commence huit à dix jours après la deuxième inoculation et dure plus d'un an. La vaccination provoque une légère escarre, au niveau des points inoculés ; dans cette lésion locale, le microbe se conserve parfois quelque temps et pourrait devenir une source de contagion. Il est atténué, il est vrai, mais il n'est pas impossible qu'il reprenne de la virulence chez un sujet un peu sensible. On fera donc bien de traiter les animaux vaccinés *comme des suspects*, c'est-à-dire de les isoler des poules neuves. Quoi qu'il en soit, si la vaccination ne s'est guère répandue, c'est avant tout pour des raisons purement économiques.

Pasteurellose bovine. — MM. Oreste et Armanni ont vacciné les buffles contre le *barbone*, en leur inoculant, soit des cultures atténuées à 30°-32° (méthode pastorienne), soit du sang de pigeon infecté (trois inoculations, à quelques jours d'intervalle).

M. Lignières a préconisé, contre la *diarrhée qui accompagne la pasteurellose bovine* et qui peut

devenir fort grave chez les jeunes veaux, l'injection intraveineuse du mélange suivant :

Sang défibriné de bœuf normal.. . .	1 partie.
Eau physiologique..	4 —

On injecte, à la dose d'un litre pour les animaux de 15-24 mois et d'un demi-litre pour les sujets moins âgés. On recommence, au besoin, le traitement, 8-10 jours plus tard. Nous avons cru devoir mentionner ici cette méthode, bien qu'elle n'ait évidemment rien à voir avec la vaccination.

Pasteurellose caprine. — Des expériences en grand, malheureusement interrompues, ont démontré à l'un de nous l'efficacité des cultures stérilisées comme moyen préventif.

Pasteurellose porcine. — Les auteurs américains ont également obtenu de bons résultats avec les cultures mortes. M. Detmers propose aussi l'emploi des vieilles cultures.

II. Hog-choléra.

(Pneumo-entérite). Il est dû à un *bacille bien distinct du genre pasteurella,* bacille mobile, à cils nombreux, sans spores. Cet organisme se montre plus court sur les milieux solides que dans les liquides ; il ne prend pas le Gram et n'offre jamais un aspect en navette aussi typique que la bactérie ovoïde. Les cultures ne présentent pas l'odeur caractéristique des pasteurellæ ; elles sont toujours plus riches que celles de ce dernier genre. Dans le bouillon, on observe un abondant développement et un léger anneau superficiel. Le lait ensemencé prend une teinte grisâtre et devient plus fluide et fortement alcalin. Sur gélose, les bacilles donnent un dépôt moins adhérent que celui des bactéries ovoïdes. *Caractère très important,*

le microbe de la pneumo-entérite pousse fort bien sur pomme de terre, sous l'aspect d'un enduit jaunâtre, qui brunit ensuite. Dans la gélatine, par piqûre, on observe un développement abondant, mais le milieu n'est pas liquéfié. Notons enfin l'anaérobiose facultative et l'absence de production d'indol.

Le bacille de hog-choléra tue, sous la peau, le lapin, la souris, le rat, le cobaye; dans les muscles, le pigeon; dans les veines, le mouton. Sous la peau, il fait périr le porc avec une tuméfaction locale, une infiltration des ganglions voisins, un état cachectique et de la diarrhée. A l'autopsie, on remarque une congestion hémorragique de la muqueuse digestive, avec ulcérations du gros intestin; les ganglions mésentériques sont souvent caséeux, la rate peu hypertrophiée. A ces lésions, décrites par M. Karlinski, M. Lignières ajoute les foyers broncho-pneumoniques et le gonflement des ganglions bronchiques. L'inoculation intraveineuse tue rapidement le porc. Par ingestion des cultures, ou mieux des organes malades, on reproduit la maladie typique. Faisons remarquer, pour terminer, que, dans l'affection naturelle ou expérimentale, les *infections secondaires* sont très fréquentes.

Les auteurs américains ont vacciné les porcs contre la pneumo-entérite, à l'aide des cultures mortes.

ROUGET DU PORC

I. Principaux caractères du bacille du rouget

Caractères morphologiques.

Le bacille du rouget est un fin bâtonnet qu rappelle assez bien comme aspect e comme dimensions le bacille de la tu berculose (fig. 183) Il est immobile, n forme pas de spore et se colore par l méthode de Gram Peu abondant dan le sang du porc at teint de la maladi naturelle et dans l sang du lapin in fecté, il se multipli au contraire considérablement chez le pigeon et l souris (*ubi infra*). D'après M. Lorenz, en bouillo très alcalin, les bacilles se montrent grêles et rectili gnes, tandis qu'en bouillon neutre, ils apparaisse plus épais et souvent onduleux. Les vieilles cultur contiennent toujours des formes filamenteuses.

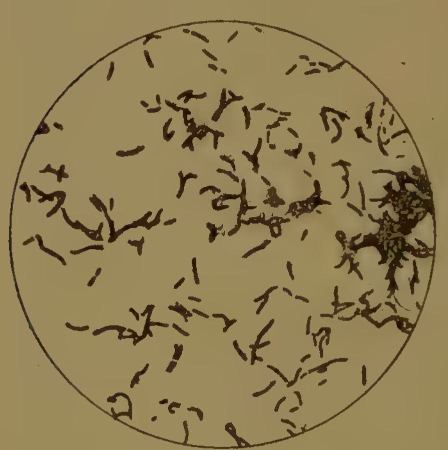


Fig. 183, — Bacille du rouget.

Caractères de culture. Caractères biologiques.

Ensemencé dans le bouillon, le bacille du roug

ne produit qu'un trouble léger ; dans le bouillon-Martin, le développement est infiniment plus marqué. Sur la gélose, on observe un semis de points d'un blanc-grisâtre. Dans la gélatine, par piqûre, l'aspect est caractéristique : c'est celui d'une petite brosse à bouteilles ; le milieu n'est jamais liquéfié. Il faut savoir cependant qu'on n'obtient pas régulièrement l'apparence typique, soit que le microbe ait fait trop de passages par l'organisme animal (Emmerich), soit que la gélatine n'offre pas une consistance convenable (Schottelius, Jensen) ; on n'aperçoit alors qu'une série de grains arrondis, échelonnés le long de la piqûre. Ajoutons qu'on doit toujours, lorsqu'il s'agit de faire, dans un but diagnostique, des ensemencements sur la gélose ou dans la gélatine, s'adresser au sang des animaux inoculés, infiniment plus riche en germes que les cultures. Le bacille du rouget pousse dans le vide aussi bien qu'à l'air, et même mieux, d'après certains auteurs. M. Kitt l'aurait transformé en un véritable *streptothrix*, par culture dans le bouillon-sérum (*aà*). Cette assertion demande à être confirmée.

Caractères d'inoculation.

Le bacille du rouget tue le pigeon, dans le pectoral, en deux à trois jours, sans symptômes bien caractéristiques. A l'autopsie, on trouve, au point inoculé, de la nécrose musculaire, se traduisant par une escarre jaune ou jaune verdâtre ; la rate est grosse ; on rencontre des ecchymoses à la base du cœur ; le foie apparaît souvent graisseux. Les microbes se montrent très abondants dans le sang et les viscères ; dans le sang, ils forment, à l'intérieur des leucocytes, des amas parfois considérables ; dans les viscères, ils encombrent littéralement l'endothélium

vasculaire. Même évolution et mêmes lésions chez la souris. Le lapin est moins sensible ; aussi convient-il, le plus ordinairement, de l'inoculer dans les veines : les bacilles sont médiocrement abondants à l'autopsie ; ils font même défaut, si la mort survient, passé six à huit jours. Le cobaye et la poule se montrent réfractaires. Le porc n'est infecté qu'avec des virus très actifs ; la voie sous-cutanée est plus sûre que l'ingestion ; lorsqu'on se décide pour ce dernier mode, on emploiera plutôt les organes des animaux morts que les cultures. Les microbes, ainsi que nous l'avons déjà dit, ne sont guère plus abondants chez le porc que chez le lapin.

Dans les laboratoires ou les abattoirs, on a vu parfois une inoculation accidentelle être suivie, *chez l'homme*, d'une rougeur érysipélateuse sans gravité. Le rouget ne paraît donc guère transmissible à l'espèce humaine. Cependant, récemment, M. Lubowski a trouvé en abondance le bacille pathogène, dans les selles d'un enfant atteint de catarrhe intestinal apyrétique, avec ictère. Le microbe isolé tuait la souris à la dose de $0^{cm},001$ (culture de 24 heures en bouillon). L'infection de l'enfant était évidemment consécutive à l'usage de viande de porc malade. On fera donc bien désormais de surveiller très soigneusement de pareilles viandes.

II. Diagnostic bactériologique du rouget.

Dans les *formes rapides*, on fera des lames avec le sang et on les colorera au Gram-éosine. Parallèlement on ne négligera jamais les ensemencements sur gélose ou en gélatine et les inoculations au pigeon ou à la souris. Le bacille du rouget est si facile à identifier, que, seul, le petit nombre des germes peut rendre le diagnostic pénible. C'est ce qui arrive dans

les *cas chroniques*, où le sang ne contient guère de microbes que lors d'une poussée aiguë.

Sur le cadavre, on aura donc soin (surtout dans les formes lentes) de ne pas se borner à l'étude du sang, mais d'examiner la rate et les ganglions lymphatiques (fig. 184), de même que l'endocarde et les synoviales, lorsqu'ils sont atteints.

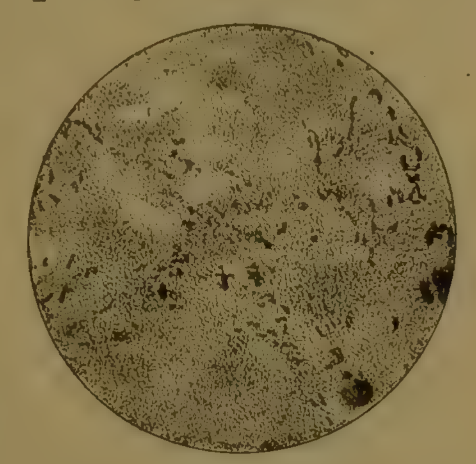


Fig. 184. — Ganglion mésentérique d'un porc mort du rouget.

III. Vaccination. — Sérothérapie.

Méthode de Pasteur. — On s'adresse de préférence aux *porcs jeunes* (deux à quatre mois), très résistants à l'affection et on choisit l'époque de l'année où celle-ci sévit avec le moins d'intensité (de novembre à avril). On inocule, à la face interne d'une cuisse, 1/8 de centimètre cube du premier vaccin et, douze jours plus tard, à la face interne de l'autre cuisse, 1/8 de centimètre cube du deuxième vaccin. L'immunité se produit douze jours environ après la seconde inoculation et dure plus d'un an. Seuls, les animaux reproducteurs devront être vaccinés chaque année. Pour ce qui concerne le *mode opératoire*, nous renvoyons au chapitre de la vaccination charbonneuse ; la technique est exactement la même.

Méthode de Lorenz. — A M. Lorenz revient le mérite d'avoir préparé, le premier, un sérum actif contre le rouget. Cet auteur a d'ailleurs modifié plu-

sieurs fois sa technique de la *vaccination par le sérum et le virus*. Actuellement, il injecte d'abord le sérum, puis, trois à cinq jours plus tard, une faible dose de culture et enfin, douze à quinze jours plus tard, une dose plus forte de culture.

Méthode de Leclainche. — En présence d'un troupeau déjà atteint, M. Leclainche injecte le sérum seul, afin d'immuniser d'emblée tous les animaux. Aux porcs de moins de 50 kilogrammes, il inocule 10 centimètres cubes; aux porcs de 50 kilogrammes et plus, 20 centimètres cubes. Puis, lorsque s'est évanouie l'immunité, toujours passagère, que confère le sérum, il procède à la vaccination par la méthode suivante, laquelle s'applique aussi, naturellement, aux troupeaux sains. On injecte d'abord un mélange de sérum et de virus [pour les animaux de moins de 50 kilogrammes, 5 centimètres cubes de sérum + 1/2 culture; pour les animaux de 50 kilogrammes et plus, 10 centimètres cubes de sérum + 1/2 culture]. Douze jours plus tard, les porcs reçoivent 1/2 culture virulente. Les inoculations se font à la face interne des cuisses, et l'on prend soin, l'opération terminée, de détruire par l'ébullition le virus non utilisé. Le sérum de Leclainche ne possède malheureusement *pas de propriétés curatives* bien marquées.

CHARBON SYMPTOMATIQUE. — BRADSOT

On sait que le charbon symptomatique, qui frappe presque exclusivement l'espèce bovine, est due au b. Chauvœi, organisme extrêmement voisin du vibrion septique de Pasteur. Suivant l'habitude prise par les auteurs, nous indiquerons les caractères du premier, en les comparant au fur et à mesure à ceux du second. Puis, nous étudierons le diagnostic et la vaccination du charbon symptomatique et nous mentionnerons brièvement une maladie du mouton qui s'en rapproche beaucoup, la bradsot des auteurs scandinaves.

I. *Principaux caractères du b. Chauvœi.*

Caractères morphologiques.

Dans le suc des tumeurs musculaires, ce sont des bâtonnets courts, dont un certain nombre se montrent déformés par la présence de spores et affectent alors le type dit *clostridium* (fig. 185). Dans la sérosité voisine, on ne rencontre que des formes végétatives. Jamais on n'aperçoit, au sein des lésions locales, ces filaments onduleux que nous avons signalés en parlant du vibrion de Pas-



Fig. 185. — B. Chauvœi dans les muscles malades.

teur; dans le liquide péritonéal des cobayes inoculés et notamment à la surface du foie, le bacille s'allonge, il est vrai, mais moins que le vibrion septique; de plus, les filaments restent droits et apparaissent constitués par des articles d'égale longueur. C'est là un *caractère important*, car, si l'on vient à rencontrer des formes géantes, ondulées, à individus manifestement inégaux, on peut être sûr que l'infection par le b. Chauvœi s'est compliquée d'une généralisation du vibrion de Pasteur. Le fait est très fréquent et cette fréquence vient diminuer la valeur de bien des travaux entrepris sur le charbon symptomatique (Leclainche et Vallée); nous ne saurions trop y insister. Dans les cultures enfin, ce sont des bacilles courts, sporulant rapidement. Le b. Chauvœi se colore bien par les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram. Il est mobile et ses cils sont disposés comme ceux du vibrion septique.

Caractères de culture. Caractères biologiques.

Il est véritablement *impossible* de distinguer les cultures du b. Chauvœi de celles de ce dernier organisme. De même, les caractères biologiques des deux bacilles sont identiques. *Un seul point* les sépare, leur réaction croisée vis-à-vis des immunsérums. Le sérum antigangreneux ne vaccine pas contre le b. Chauvœi et met plus de 24 heures à l'agglutiner au 30e, tandis qu'il vaccine contre le v. septique et l'agglutine instantanément au 30e, rapidement au 15 000e et toujours, bien que plus ou moins lentement, au 30 000e. Inversement, le sérum anticharbonneux ne vaccine pas contre le v. septique et met plusieurs heures à l'agglutiner au 30e, tandis qu'il vaccine contre le b. Chauvœi et l'agglutine à un taux qui peut atteindre 1 pour 6 000 (Leclainche et Vallée). Le b. Chauvœi

se montre très résistant à la dessiccation, par exemple dans la « poudre Arloing », dont il a été parlé ailleurs.

Caractères d'inoculation.

Les animaux de choix sont, ici encore, le cobaye et le mouton. On les inocule habituellement dans les muscles de la cuisse. L'infection est bientôt suivie d'un engorgement, qui ne tarde pas à gagner tout le membre et à gêner considérablement la marche. La tumeur devient crépitante et l'animal succombe le 2e ou le 3e jour. A l'autopsie, les *lésions* sont *identiques à celles de la septicémie gangreneuse* ; l'œil le mieux exercé ne saurait en effet reconnaître un cobaye inoculé avec le b. Chauvœi d'un cobaye inoculé avec le v. septique. En employant un virus actif, MM. Leclainche et Vallée tuent le cobaye, sous la peau ou dans les muscles, en 18-24 heures et, dans le péritoine, en 12 heures ; ils inoculent, pour cela, de 3 à 4 centimètres cubes de culture en bouillon-Martin. L'injection du même virus, par la voie intra-cérébrale, amène une mort rapide, due à des phénomènes toxiques.

Le lapin est assez résistant à l'infection intramusculaire ; mais, en usant de certains artifices déjà mentionnés (injection concomitante d'acide lactique, de méthylamine, de cultures vivantes ou stériles de b. prodigiosus ; ou bien inoculation au sein d'une ecchymose..., etc...), on arrive aisément à le faire périr. On le tue aussi par la voie intraveineuse ; des doses convenables de virus actif peuvent même occasionner la mort en quelques heures et même en quelques minutes, par intoxication (Leclainche et Vallée). L'inoculation intrapéritonéale est moins dangereuse que l'inoculation sous-cutanée, à quantité égale de culture.

Les bovidés succombent rapidement, quand on les infecte sous la peau en « région défendue », tandis qu'ils guérissent presque toujours (et acquièrent l'immunité), quand on les infecte en « région permise » (rayons inférieurs des membres et queue). Dans le premier cas, on tue aisément avec 2 centimètres cubes de culture active en bouillon. L'injection intraveineuse est bien supportée d'ordinaire et confère une immunité solide aux bovidés, comme au mouton.

La chèvre se montre sensible, les autres animaux réfractaires. L'un de nous a pu tuer cependant le pigeon sans difficulté, en additionnant les cultures d'acide lactique.

II. *Diagnostic bactériologique du charbon symptomatique.*

1° Sur le vivant. — Le diagnostic ne peut être établi qu'en présence des *tumeurs caractéristiques*. On prélèvera le suc de celles-ci, ainsi que la sérosité voisine, le plus aseptiquement possible. Dans les frottis sur lames, on cherchera les formes sporulées, mais celles-ci ne sont pas toujours aussi faciles à distinguer qu'on pourrait le croire. Il existe, en effet, au sein des tissus malades, un grand nombre de microbes étrangers, dont certains sont, eux aussi, munis de spores. Nous ne savons pas, il est vrai, si l'on a jamais rencontré, parmi ces derniers, des types vraiment clostridiens. Il résulte, en tous cas, des associations bactériennes, une réelle difficulté pour isoler le b. Chauvœi à l'état de pureté, d'autant que plusieurs des germes concomitants sont des anaérobies stricts ou facultatifs. On s'adressera donc en général plutôt à l'inoculation qu'à la culture. L'animal choisi sera le cobaye, plus économique que le mouton ; on l'inoculera dans les muscles de la cuisse.

2° **Sur le cadavre.** — On trouvera souvent le virus à l'état pur dans le sang et le liquide péritonéal et même dans les ganglions voisins de la région atteinte. On examinera ces produits au microscope et on les placera avantageusement à l'étuve, dans une ampoule scellée, pour les enrichir en germes. Le contenu des ampoules servira ensuite à faire des cultures et des inoculations.

On n'oubliera pas que les *tumeurs* charbonneuses *peuvent faire défaut ou n'offrir que des dimensions très restreintes* (toute la lésion locale se borne alors à la nécrose de quelques faisceaux musculaires). Lorsque, de plus, le *siège* des lésions est tout à fait *anormal* (langue, voile du palais, parois pharyngo-œsophagiennes, cornets éthmoïdaux, etc...), le diagnostic ne saurait être établi qu'après une autopsie des plus minutieuses.

Si l'autopsie doit être parfois minutieuse, elle ne doit jamais être tardive. Autrement, on est exposé à rencontrer le vibrion septique, dont la présence faussera le diagnostic. Le v. septique a une telle tendance à déplacer le b. Chauvœi que, lorsqu'on pratique plusieurs passages par le cobaye, en partant d'un virus charbonneux *pur*, on peut ne retrouver finalement que l'organisme de Pasteur (Leclainche et Vallée). Nous rappelons ce fait, pour qu'on soit bien mis en garde contre une erreur particulièrement grave. D'autant plus grave, que beaucoup d'affections, qui semblent identiques au charbon symptomatique, sont dues en réalité au vibrion septique, ou a certaines variétés de cet organisme.

Lorsqu'on n'aura en mains que des *fragments de viande* malade, on sera déjà mis sur la voie du diagnostic par l'odeur butyrique qu'ils présentent.

Le charbon symptomatique ne sera guère con-

fondu aujourd'hui avec le charbon bactéridien, bien que les deux épidémies puissent coïncider. Si les agents pathogènes offrent quelques ressemblances morphologiques, les cultures et les inoculations permettront une différenciation facile. La bactéridie poussera notamment en plaques de gélatine et tuera toujours le lapin.

III. *Vaccination contre le charbon symptomatique.*

On peut vacciner les animaux, soit par le virus virulent en employant la voie intraveineuse, soit par le virus affaibli introduit sous la peau.

1. *Vaccination par la voie intraveineuse.*

A l'aide d'un trocart à *double* canule, on injecte 4 à 6 centimètres cubes de sérosité virulente. Il faut, à tout prix, éviter la pénétration du liquide dans la gaine celluleuse qui entoure le vaisseau et, à plus forte raison, dans les tissus voisins ; sinon, on déterminerait l'apparition d'une lésion locale, suivie de mort rapide. Lorsque l'opération est bien réussie, on note, pendant 2 à 3 jours, quelques troubles généraux, puis tout rentre dans l'ordre.

2. *Vaccination par le procédé classique.*

La méthode précédente a été abandonnée par ses auteurs, MM. Arloing, Cornevin et Thomas, après avoir donné d'ailleurs d'excellents résultats pendant plusieurs années. Ils lui ont substitué l'usage de leurs vaccins (décrits autre part). Ces vaccins ont d'abord été inoculés exclusivement à la queue, puis, sous l'influence des travaux des vétérinaires allemands et suisses (Kitt, Strebel, Zimmermann, Guillod et

Simon), on n'a pas craint d'opérer sur certaines régions défendues (épaule, tiers postérieur du thorax), infiniment préférables au point de vue de la facilité de l'opération. Bien que les résultats se soient montrés satisfaisants, on en revient cependant peu à peu à l'*ancien procédé*, que nous décrirons seul ici.

On injecte les deux *vaccins d'Arloing* à 10-12 jours d'intervalle. La technique est toujours la même. On verse le contenu d'un paquet (poudre vaccinale) dans un mortier stérilisé à l'eau bouillante et on ajoute, peu à peu, en triturant, 10 centimètres cubes d'eau bouillie. On filtre, sur un linge bouilli encore humide et on inocule, avec une seringue spéciale, 1 centimètre cube de liquide, pour les animaux de 18 mois et plus et 1/2 à 3/4 de centimètre cube, pour les animaux de 6 à 18 mois. Avant d'inoculer, on a coupé les poils de la queue, sur une étendue de quelques centimètres et on a soigneusement savonné la peau. Les résultats obtenus sont excellents. La plus forte mortalité n'excède pas 4 pour mille.

Il est certain néanmoins que les vaccins, obtenus par MM. Leclainche et Vallée avec les cultures pures en sang, seront avantageusement substitués aux vaccins impurs dont il vient d'être question. Quant au procédé nouveau des auteurs toulousains (culture chauffée, puis culture fraîche), qui semble appelé à se substituer aux autres, il n'a pas encore été appliqué en grand ; il ne devra pas, du reste, faire oublier les services importants qu'a rendus la méthode lyonnaise.

Nous rappellerons, en terminant, que les bovidés au-dessous de 5-6 mois et notamment les animaux non sevrés, se montrent très résistants au charbon symptomatique — que, d'autre part, les sujets âgés de plus de 4 ans sont presque toujours devenus ré-

fractaires (à la suite d'infections légères) dans les pays contaminés — et qu'enfin, certaines races jouissent d'une médiocre réceptivité, tel le bétail algérien, qui supporte impunément l'inoculation unique du second vaccin d'Arloing en région défendue (Brémond).

La *sérothérapie* n'a encore donné aucun résultat pratique, en ce qui concerne le charbon symptomatique.

IV. *Bradsot.*

C'est une *affection épizootique du mouton*, qui sévit en Islande, en Norvège, dans les îles Feroë, en Cornouailles, et, exceptionnellement, en Prusse. Elle a été étudiée par MM. Nielsen et Jensen. Tantôt, la mort survient, dans l'espace de quelques heures, au milieu de phénomènes généraux et abdominaux très violents ; tantôt, elle est moins rapide et on voit apparaître des tumeurs diffuses en différents points ; l'animal n'en succombe pas moins d'ordinaire. Les lésions musculaires sont les mêmes que dans le charbon symptomatique ; on note, de plus, une infiltration séro-hémorragique du tube digestif. Le foie et le rein se montrent volumineux, la rate quelquefois hypertrophiée. Le bacille pathogène se rencontre partout ; il paraît identique au b. Chauvœi et se cultive particulièrement bien dans les milieux-sérum.

L'inoculation sous-cutanée, chez le mouton, reproduit la maladie naturelle ; par contre, l'ingestion échoue complètement. Le bacille de la bradsot tue le veau sous la peau et le porcelet dans le péritoine ; il tue, sous la peau, le cobaye, la souris, la poule et le pigeon, mais ne donne le plus souvent au lapin qu'une lésion locale curable.

M. Nielsen vaccine le mouton avec de la poudre

de reins malades desséchés ; les animaux présentent une réaction locale et générale et acquièrent l'immunité en 10 jours. M. Jensen a obtenu de bons résultats par ce procédé ; il affirme, de plus, que les moutons, devenus réfractaires à la bradsot, n'ont acquis aucune résistance vis-à-vis du b. Chauvœi.

Nous nous contenterons de citer ici le *charbon symptomatique du porc,* décrit par M. Marek et causé par une variété de b. Chauvœi, qui tue le porc sous la peau, détermine également la mort du cobaye et du lapin dans les mêmes conditions, mais épargne toujours le pigeon et le plus souvent le mouton.

AFFECTIONS DES ANIMAUX DUES AUX COLIBACILLES

Les colibacilles habitent *normalement* le tube digestif des animaux. Ils peuvent occasionner *diverses maladies,* dont les principales sont réunies dans le tableau suivant :

Colibacilloses aviaires.		Psittacose (voir ce chapitre).
		Septicémie des poules et des dindes.
		Septicémie des faisans.
		Septicémie des pigeons.
Colibacilloses des mammifères.		Diarrhée des veaux.
		Septicémie des veaux.
		Coryza gangreneux des bovidés.
	Lésions diverses (Jensen.)	Cystites et pyélonéphrites (chien, porc).
		Endocardites, endométrites, abcès prostatiques (chien).
		Mastite suppurée (vache).

Nous avons déjà parlé de la maladie des poules et des dindes, due à un colibacille type. La maladie des pigeons a été également mentionnée. Celle des faisans, décrite par M. Klein, est produite par un colibacille spécial, qui tue le faisan sous la peau, mais se montre inoffensif pour le cobaye, le lapin, la poule et le pigeon.

Nous dirons maintenant quelques mots des trois *colibacilloses des bovidés.*

Diarrhée des veaux.

(*Dysenteria alba*). — Elle reconnaît pour cause

un organisme, étudié par M. Jensen et qui paraît répondre au b. coli type. Cet organisme se retrouve dans le tube digestif normal des veaux. Il *se généralise* au cours de la maladie ; on l'isolera donc facilement du sang et des viscères. Il tue, par la voie sous-cutanée et par ingestion, les animaux nouveau-nés (de moins de deux jours), mais épargne les sujets plus âgés. Les échantillons très virulents font périr, sous la peau, le cobaye, le lapin, la souris et le pigeon. La *viande* des veaux morts de dysenteria alba est *dangereuse* pour l'homme.

Septicémie des veaux.

(Thomassen). Elle est due à un colibacille spécial qui, d'après les caractéristiques du tableau que nous avons donné précédemment, répondrait à la formule : — — + + ; c'est-à-dire qu'il ne fermente pas les sucres et ne coagule pas le lait. Le typhusserum l'agglutine un peu. *On l'isole* aisément *de l'urine* pendant la vie, *du sang* et *des viscères* après la mort. L'inoculation sous-cutanée et l'ingestion permettent de reproduire la maladie chez les veaux âgés de moins de 3 mois. On observe, comme dans l'affection naturelle, la fièvre, l'albuminurie et la bactériurie si caractéristique. A l'autopsie, la rate est grosse ; on trouve une adénopathie généralisée, des ecchymoses de la muqueuse digestive et une néphrite hémorragique. Le microbe de Thomassen tue le lapin, sous la peau, avec néphrite et bactériurie ; il tue, par la même voie, le cobaye et la souris. Le chien et le cheval sont réfractaires.

Coryza gangreneux des bovidés.

M. Leclainche a montré que cette affection est cau-

sée par un colibacille, qui ne se rencontre que dans les lésions. Ce colibacille tue le lapin et le cobaye. Le bœuf résiste à l'ingestion, mais meurt de l'inoculation intraveineuse. On note alors du jetage et de la salivation et, à l'autopsie, des lésions qui rappellent celles de la maladie naturelle. L'inoculation des cultures chauffées produirait les mêmes effets que celle du virus vivant.

AFFECTIONS DES ANIMAUX DUES AUX STREPTOCOQUES

I. *Mammite contagieuse des vaches laitières.*

Elle est due à un streptocoque, étudié par MM. Nocard et Mollereau, et facile à isoler du lait et de la glande malade. Il forme des chaînettes excessivement longues dans les milieux liquides (fig. 186) et se colorerait médiocrement par le Gram. Il pousse aisément dans le bouillon ordinaire, en formant des flocons ; le développement est toutefois plus riche dans le bouillon sucré ou glycériné. Les cultures sont peu abondantes sur la gélose et dans la gélatine, très chétives sur la pomme de terre. Le lait est coagulé en 24 à 30 heures. Dans le bouillon simple et surtout dans le bouillon sucré ou glycériné, il se produit une acidification rapide. Enfin, la croissance peut être obtenue à l'abri de l'air.



Fig. 186. — Streptocoque de la mammite des vaches.

Le streptocoque de MM. Nocard et Mollereau n'est pathogène que pour la vache et la chèvre. Lorsqu'on inocule, dans la mamelle de ces animaux, des cultures en bouillon sucré (additionné de carbonate de

chaux, pour combattre la trop grande acidification), il se produit, après quinze jours, un noyau induré, identique à celui qui marque le début de l'affection naturelle, puis la maladie évolue comme d'habitude.

Nous rappellerons que *la mammite peut être traitée* avec succès, tant qu'un tiers environ de la glande n'est pas atteint. Dans le cas de lésions récentes, on injecte, deux à trois fois, à 5 ou 6 jours d'intervalle, une solution tiède d'acide borique (4 pour 100), par le trayon correspondant au lobe malade ; la guérison survient sans peine, mais le lobe en question ne donne plus dorénavant autant de lait que les autres. Dans le cas de lésions plus anciennes, on pratique les injections quatre à cinq jours de suite ; après guérison, la sécrétion lactée ne reparaît plus dans les parties atteintes (Nocard).

Le lait des vaches malades « tourne » facilement ; son mélange avec d'autres laits les coagule ; enfin, on l'a vu plusieurs fois provoquer des *accidents chez l'homme,* accidents à forme ordinairement épidémique (Holst).

II. *Gourme.*

Affection protéiforme du cheval, due au streptocoque de Schütz. Nous avons mentionné, à propos de la pasteurellose équine, le rôle secondaire, si important, joué par cet organisme et les restrictions que les travaux de M. Lignières semblent imposer à bien des diagnostics de gourme primitive.

Le *microbe de Schütz* a été rencontré dans les écuries (litières, purin), les fourrages, le tube digestif et les fosses nasales des chevaux sains. Dans la gourme purulente, il est localisé d'ordinaire aux lésions; dans la gourme septicémique, il ne se généralise qu'à

certains moments, mais il peut être alors décelé partout, même au niveau des manifestations cutanées. Il n'offre, morphologiquement, rien qui le distingue des autres streptocoques. Ensemencé dans le bouillon, il se développe, au fond du tube, sous l'aspect de flocons ; la culture est plus riche, si l'on additionne le bouillon de sérum. La croissance se fait mal sur gélose et en gélatine, elle peut même n'avoir pas lieu. Sur pomme de terre, elle manque constamment. Le lait est coagulé plus ou moins vite. Sur sérum solidifié, on observe un semis de taches grisâtres, demi-transparentes, qui deviennent confluentes ; le sérum constitue le meilleur milieu d'isolement. Enfin, le streptocoque gourmeux pousse mieux dans le vide qu'à l'air.

L'inoculation, sur les muqueuses nasale ou laryngée du cheval, reproduit l'affection type ; l'inoculation sous-cutanée est suivie d'un abcès ; l'inoculation intraveineuse, très bien supportée, donnerait l'immunité (Sand et Jensen). Le mulet se montre moins sensible que le cheval, l'âne et le bardot encore moins. On tue facilement la souris sous la peau ; avec un virus très actif, on observe un simple œdème local et des lésions septicémiques ; avec un virus plus faible, un abcès local et même des suppurations viscérales. Le lapin succombe en 36-60 heures à l'injection intraveineuse ; on trouve, à l'autopsie, des lésions septicémiques, mais les streptocoques restent peu nombreux dans le sang et les viscères. Le cobaye meurt de l'inoculation intrapéritonéale, si la quantité et l'activité du virus sont suffisantes ; dans l'exsudat local, on retrouve le microbe de Schütz en abondance.

Le *diagnostic bactériologique* de la gourme se fera par l'examen microscopique, toujours suivi de la culture sur sérum coagulé et de l'inoculation sous la

peau de la souris ou dans le péritoine du cobaye. *La gourme n'est pas justiciable du sérum de Marmorek.*

M. Lignières a rencontré un streptocoque à type gourmeux dans le liquide céphalo-rachidien et les reins de chevaux qui avaient succombé à la *paraplégie* dite *classique* (c'est-à-dire survenant brusquement, en hiver, chez des sujets vigoureux, remis au travail après un certain repos), accompagnée ou non d'hémoglobinurie.

III. *Anasarque du cheval.*

Maladie occasionnée par une variété du *streptocoque* pyogène, *identique au streptocoque de Marmorek* (Lignières). L'organisme pathogène se rencontre, non seulement dans les lésions (œdèmes, pétéchies), mais encore dans les premières voies du cheval sain et dans le milieu extérieur.

Nous indiquerons ici, d'après MM. Nocard et Lignières, la manière dont doit être conduit le *traitement par le sérum* de Marmorek, traitement qui abaisse la mortalité de 77 à 19 pour 100 (Mouilleron et Rossignol). Il faut intervenir le plus tôt possible. Tout à fait au début, on peut juguler la maladie en un ou deux jours. Plus tard, on commencera par une dose de 30 centimètres cubes et on répétera les injections jusqu'à cessation de la fièvre, affaissement des engorgements et disparition des taches purpuriques. Dans les cas sérieux, il est indiqué d'inoculer 30 centimètres cubes les quatre premiers jours et 20 centimètres cubes le cinquième et le sixième. Dans les cas très graves, la première dose sera portée à 40 centimètres cubes. Il convient de ne pas cesser trop tôt le traitement, sans quoi on s'expose aux rechutes. *On s'abstiendra* absolument *de toute thérapeutique locale,*

telle que frictions irritantes sur les engorgements. Le sérum sera injecté à l'encolure, derrière l'épaule, au niveau des parois costales, par fractions de 10 centimètres cubes, avec 25 centimètres environ d'intervalle entre chaque piqûre. Au point inoculé on voit apparaître, vers la troisième heure, un œdème chaud et douloureux, qui se résorbe en un jour ou un jour et demi, sans laisser de traces.

MAMMITE GANGRENEUSE
DES BREBIS LAITIÈRES (ARAIGNÉE)

L'agent pathogène a été découvert par M. Nocard. C'est un *microcoque*, qui se rencontre abondamment dans le lait, dès le début des accidents; il est peu répandu dans la sérosité de l'œdème mammaire, encore moins répandu dans la cavité péritonéale; enfin, il fait défaut dans le sang et les viscères. Ses caractères morphologiques n'offrent rien de spécial; il se colore bien par le Gram.

Il pousse énergiquement dans le bouillon et surtout dans le bouillon sucré; le milieu s'acidifie en proportion de sa richesse saccharine. Sur la gélose, il forme un enduit blanchâtre ; sur la pomme de terre, un mince dépôt, qui ne tarde pas à jaunir. Il liquéfie la gélatine, et, à un moindre degré, le sérum solidifié. Il coagule rapidement le lait. C'est un anaérobie facultatif. L'injection du virus, dans les canaux galactophores de la brebis, reproduit la maladie naturelle, bientôt suivie de mort; l'injection, même en plein parenchyme mammaire, n'amène chez la chèvre qu'une tuméfaction transitoire. Enfin, l'inoculation sous la peau du lapin engendre un vaste abcès qui guérit.

AFFECTIONS DUES AU BACILLE DE PREISZ-NOCARD

Ce bacille a été rencontré tout d'abord, par MM. Preisz et Guinard (1891), dans des abcès du rein, survenus chez un mouton ; puis, par M. Preisz (1894), dans une pseudo-tuberculose du même animal. M. Nocard l'a observé, depuis 1892, dans l'affection qu'il a nommée lymphangite pseudo-farcineuse du cheval. Enfin, il a été retrouvé, chez le mouton, par MM. Cherry et Bull à Melbourne, et par M. Sivori dans l'Argentine.

Il détermine, chez le cheval, un pseudo-farcin, aigu ou chronique, sans tendance au phagédénisme, sans retentissement ganglionnaire, peu contagieux et souvent curable. Rarement l'affection se complique d'embolies pulmonaires ou d'abcès rénaux (Nocard). *Il détermine* le plus ordinairement, *chez le mouton, une broncho-pneumonie caséeuse,* avec pleurésie et dégénérescence caséeuse des ganglions médiastinaux et bronchiques. Cette broncho-pneumonie s'accompagne fréquemment de granulomes du foie et même du rein. Le bacille de Preisz-Nocard est donc un agent de pseudo-tuberculose.

I. *Principaux caractères du bacille de Preisz-Nocard.*

Caractères morphologiques.

C'est un microbe *très polymorphe,* pouvant donner des formes rameuses. Dans le pus ou la matière

caséeuse, il offre l'aspect de bâtonnets épais, courts, parallèles, intra et extraleucocytaires. Dans le bouillon, ce sont de fins bacilles, rappelant tout à fait ceux de Löffler; dans le bouillon glycériné, l'apparence est cocco-bacillaire. On observe des différences analogues, entre les cultures sur gélose simple et sur

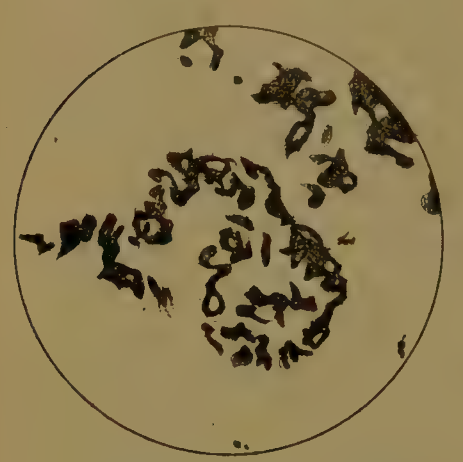


Fig. 187. — Bacille de Preisz-Nocard. Culture de 24 heures sur gélose.

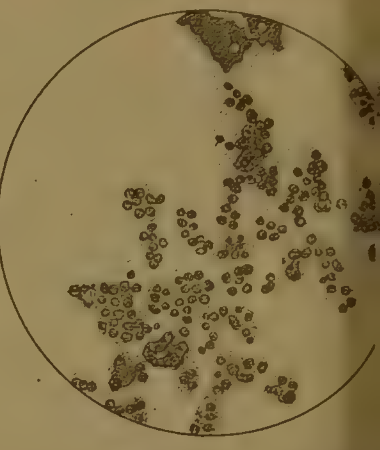


Fig. 188. — Bacille de Preisz-Nocard. Culture de 24 heures sur gélose glycérinée.

gélose glycérinée (fig. 187-188). Les vieilles cultures contiennent de nombreux types involutifs. Le microbe prend le Gram.

Caractères de culture. — Caractères biologiques.

En bouillon, l'aspect est celui des cultures diphtériques; on voit apparaître de petits grains, qui se déposent au fond du tube; en même temps, se forme un voile plus ou moins épais. En gélatine, la croissance est faible ou nulle. Sur gélose, se développe une couche blanchâtre, non adhérente. Sur pomme de terre, on observe une fine pellicule, d'un blanc sale, pulvérulente; sur pomme de terre glycérinée,

un enduit abondant et humide. Le milieu d'élection et le sérum coagulé (fig. 189); les colonies s'y montrent sous l'aspect d'amas blanchâtres (sérum de cheval), ou jaunes serin (sérum de bœuf), qui pénètrent dans le milieu, en formant de petites houppes villeuses ; cet *aspect* est absolument *caractéristique*. Le bacille de Preisz-Nocard pousse médiocrement dans le lait, sans le coaguler. C'est un aérobie strict. Il ne fait pas fermenter les sucres.



Fig. 189. — Bacille de Preiss-Nocard. Culture sur sérum.

Caractères d'inoculation.

Lorsqu'on inocule, *en petite quantité,* des produits pathologiques dans le péritoine du cobaye mâle, on voit survenir, après 36 heures ou plus, une *orchite* simulant la vaginalite que donne le bacille morveux. Cette orchite peut guérir par ouverture du foyer ; la cicatrisation se fait ensuite lentement. A l'inverse du sarcocèle morveux, la lésion est constituée par une suppuration qui intéresse, non seulement la vaginale, mais encore le testicule lui-même. A l'autopsie, on trouve, en dehors de ces altérations, des foyers purulents ou caséeux, dans le mésentère, l'épiploon, le foie, la rate et les poumons. Lorsqu'on inocule en petite quantité des cultures récentes, ou en quantité plus grande des cultures anciennes, on reproduit le même tableau anatomo-clinique. Au contraire, si l'on fait usage de produits pathologiques ou de cultures récentes *à dose plus forte*, on tue l'animal en 24 ou 48 heures, sans lésions testiculaires. Le péritoine

présente alors un exsudat abondant, les viscères abdominaux sont congestionnés et il existe des foyers nettement purulents dans l'épiploon ; toutefois, le sang ne donne pas habituellement de cultures positives. Sous la peau du cobaye, le bacille de Preisz-Nocard occasionne un abcès à guérison lente, souvent suivi d'abcès circonvoisins, mais sans retentissement ganglionnaire.

L'infection intrapéritonéale ne tue pas le lapin ; l'injection intraveineuse détermine une pseudo-tuberculose miliaire, ou un état cachectique mortel sans lésions ; dans ce dernier cas, le bacille a déjà disparu de l'organisme lors de la mort. L'inoculation sous la peau de l'oreille produit un *érysipèle type,* très marqué mais bénin ; tout au plus y a-t-il parfois une escarrification consécutive, d'ailleurs limitée. La souris succombe, en 24 ou 48 heures, à l'infection sous-cutanée ; le sang du cœur donne généralement des cultures. Le pigeon est parfois tué dans les veines ; la poule se montre réfractaire. Le chien et la chèvre contractent un abcès local, par inoculation dans le tissu cellulaire, le rat blanc également ; mais, chez ce dernier, on peut voir survenir des foyers viscéraux (rénaux principalement).

Un virus actif peut tuer le mouton sous la peau, sans généralisation ; un virus faible lui donne simplement une suppuration locale. L'injection intrapulmonaire détermine une pleuro-pneumonie caséeuse, rapidement mortelle ; si les cultures sont peu virulentes, la mort survient tardivement et l'analogie est encore plus complète avec la maladie naturelle (Sivori).

Chez le cheval, l'âne et le mulet, l'inoculation sous-cutanée est suivie d'un abcès bénin. Chez le cheval, M. Nocard a réussi à reproduire la lymphangite pseudo-farcineuse, en injectant des cultures dans

une tumeur sanguine. Cette tumeur avait été réalisée, quelques jours auparavant, par une dilacération sous-cutanée aseptique. On n'obtient rien chez le cheval par la voie intraveineuse.

II. *Diagnostic bactériologique des affections dues au bacille de Preisz-Nocard.*

Chez le cheval. — Tout cheval, atteint d'une lésion d'aspect farcineux, sera soumis à l'épreuve de la malléine. Si cette épreuve reste négative, on pensera immédiatement à l'une des 3 principales *affections pseudo-farcineuses* : la lymphangite gourmeuse, la lymphangite épizootique ou la lymphangite de Nocard. Le pus sera donc examiné au microscope cultivé et inoculé. Dans le cas d'une lymphangite à bacille de Preisz-Nocard, l'étude microscopique montrera des bâtonnets d'aspect pseudo-diphtérique, colorés par le Gram, intra et extraleucocytaires. Dans les cultures, faites sur un sérum de bœuf coagulé, l'apparition de la couche jaune serin, avec ses radicelles si caractéristiques, ne saurait laisser aucun doute. Les inoculations au cobaye mâle, par la voie abdominale, seraient évidemment de nature à tromper ; toutefois, on se souviendra qu'il s'agit ici d'une orchite vraie, parfois curable et dans le pus de laquelle on retrouve, en quantité énorme, des bacilles bien différents des bacilles morveux.

Chez le mouton. — Le microbe de Preisz-Nocard sera recherché dans toute affection d'allure pseudo-tuberculeuse ou pyémique. L'étude histologique, les cultures et les inoculations établiront toujours facilement le diagnostic.

SEPTICÉMIE VIBRIONNIENNE

Nous l'avons déjà mentionnée. Elle est due au *vibrio Metchnikowii*, dont nous nous contenterons d'indiquer les caractères essentiels. C'est un organisme virgulaire, unicilié, ressemblant beaucoup à l'agent du choléra. Il liquéfie plus rapidement la gélatine, se développe abondamment sur pomme de terre, coagule le lait et donne la réaction indol-nitreuse. Il tue le pigeon dans le pectoral, le poulet par ingestion, la poule adulte et le lapin dans le poumon, le cobaye sous la peau. Étant donnés sa tendance septicémique et ses caractères bien nets, il sera toujours aisément diagnostiqué.

SPIRILLOSE DES OIES

Les oies présentent assez souvent, dans le Caucase, une septicémie spéciale, décrite par M. Sakharof et causée par un microbe très voisin de celui d'Obermeïer. Cette septicémie se caractérise par de l'anorexie, de la fièvre, quelquefois de la diarrhée et de la sensibilité des pattes. La mortalité atteint 80 pour 100. La mort survient au bout de 4-5 jours. Quand l'animal guérit, il est à l'abri de toute récidive ultérieure. A l'autopsie, on trouve une dégénérescence graisseuse du cœur et du foie. La rate, molle et hypertrophiée, ne renferme plus de spirilles ; elle en contient au contraire pendant la vie. Telle est cette *curieuse affection,* que nous n'avons pas cru devoir passer sous silence, d'autant qu'elle a donné lieu à d'intéressants travaux expérimentaux.

Le spirille de la septicémie des oies est plus gros que celui de la fièvre récurrente. Il est mobile comme lui, se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et se décolore par le Gram.

Lorsqu'on inocule, dans les veines ou sous la peau d'une oie saine, un peu de sang d'une oie malade, on reproduit absolument la maladie naturelle. Les spirilles envahissent le sang dès le deuxième jour. Ils atteignent leur maximum le troisième ou le quatrième et forment alors des pelotons énormes, puis ils disparaissent. Quand on tue les animaux avant l'apparition des spirilles, on ne trouve ceux-ci que dans le foie et dans la rate (fig. 190) ; quand on les tue après la disparition des spirilles, on rencontre quelquefois encore ceux-ci dans la moelle

des os. Le canard est sensible à l'inoculation, mais l'affection se montre moins grave chez lui que chez l'oie. Chez la poule, l'inoculation du sang infecté détermine une maladie bénigne, qui guérit d'ordinaire. Les jeunes poussins, âgés d'une à quatre semaines, sont par contre très sensibles. Les autres animaux demeurent réfractaires.

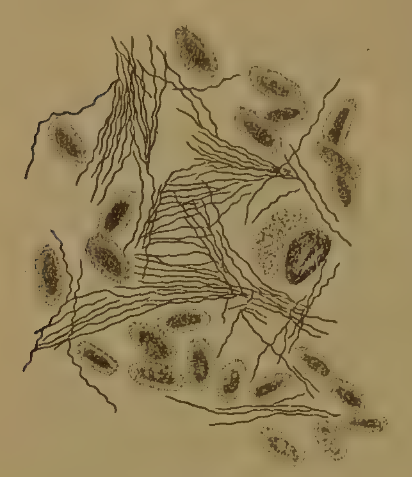


Fig. 190. — Spirilles des oies dans la rate (d'après Cantacuzène).

La vie du parasite *in vitro* est d'autant plus courte qu'il a été recueilli à un stade plus avancé de la septicémie. Mais si on ajoute, à un sang très riche en spirilles, 1/20 à 1/30 de bouillon, ce sang conserve pendant deux à trois semaines sa virulence (Gabritchewsky). Tous les essais de culture ont échoué. Nous ne pouvons que signaler ici les intéressantes recherches de M. Cantacuzène, recherches dirigées au point de vue exclusif de la phagocytose.

FARCIN DU BŒUF

Le farcin du bœuf, jadis assez répandu en France, en a disparu peu à peu. Il existe encore à la Guadeloupe, où M. Couzin l'a étudié. En 1888, M. Nocard a isolé le *streptothrix pathogène,* de pièces recueillies par cet auteur. La maladie n'atteint que les bovidés et se traduit par les lymphangites et des adénites, à évolution lente. Le farcin de la Guadeloupe paraît bien plus grave que l'ancien farcin de France ; il amène fréquemment la mort et peut se compliquer de lésions viscérales.

Le streptothrix de Nocard (fig. 191) est en général court et peu ramifié ; il se colore par la méthode de Gram et, ainsi que l'un de nous l'a observé, par la méthode de Kühne.

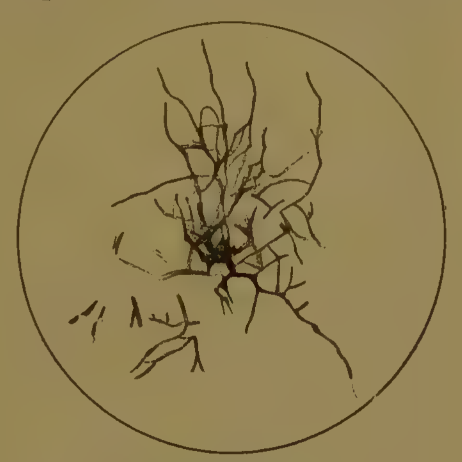


Fig. 191. — Streptothrix du farcin du bœuf. Culture en bouillon.

Il donne, en bouillon glycériné, des flocons et un voile épais, d'aspect gras ; en bouillon simple, il pousse un peu moins abondamment. Sur gélose glycérinée, ce sont des amas écailleux, opaques, saillants, de couleur jaunâtre ; même aspect sur gélose simple (où les cultures se développent un peu plus lentement) et sur pomme de terre. Le sérum solidifié convient moins bien que la gélose. Le lait

constitue un milieu médiocrement favorable ; il ne se coagule pas.

Le microbe de Nocard est un aérobie strict. Il ne fermente pas les sucres. Il donne des conidies à la longue, comme toutes les oospora.

Inoculé sous la peau du cobaye, il détermine un abcès (fig. 192) suivi de lymphangite et d'adénite. Cet abcès guérit lentement, disent les auteurs, en laissant une induration des lymphatiques et des ganglions. L'un de nous a constaté que l'animal peut parfaitement succomber en quelques semaines. L'injection dans les veines produit une pseudo-tuberculose miliaire généralisée. L'inoculation dans le péritoine amène la mort en 10 à 20 jours. A l'autopsie, on constate une pseudo-tuberculose de la séreuse ; l'épiploon forme un boudin volumineux et mamelonné. Par la voie sous-cutanée, on provoque, chez le mouton et la vache, une série d'abcès successifs à évolution lente ; par la voie intraveineuse, une pseudo-tuberculose miliaire curable. Si l'on sacrifie les animaux, on trouve dans le poumon de beaux tubercules, avec cellules géantes typiques ; dans ces cellules siègent de nombreux streptothrix, facilement reconnaissables et qui ne donnent jamais naissance à des renflements en massue. Le lapin, le chien, le chat, le cheval sont peu sensibles ; l'injection sous-cutanée

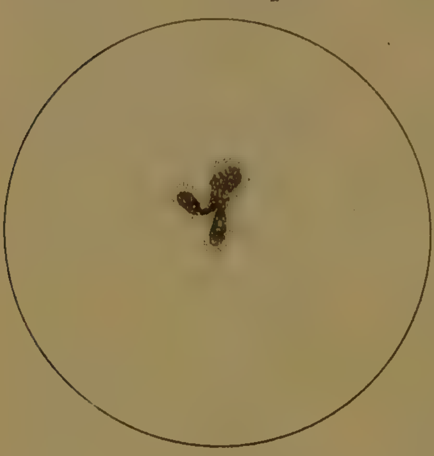


Fig. 192. — Farcin du bœuf. Pus de cobaye inoculé.

n'engendre chez eux qu'un abcès très limité et fort bénin.

Le *diagnostic* du farcin du bœuf sera assuré par l'examen microscopique du pus, les cultures dans les milieux glycérinés et l'inoculation au cobaye. Le traitement par KI n'est suivi d'aucun effet.

PÉRIPNEUMONIE

Affection spéciale aux bovidés, dont le microbe, découvert par MM. Nocard et Roux, appartient au groupe des organismes dits « invisibles ».

I. *Principaux caractères du microbe de la péripneumonie.*

Caractères morphologiques. Caractères de culture. Caractères biologiques.

L'agent pathogène est constant dans les lésions pulmonaires (naturelles) ou sous-cutanées (expérimentales) des bovidés adultes et dans les lésions articulaires (expérimentales) des jeunes animaux. Il est constitué par des *granulations* réfringentes, mobiles, *excessivement fines,* dont les plus forts grossissements ne peuvent indiquer nettement les caractères. *Il traverse le filtre Berkefeld et la bougie Chamberland* du type *perméable* (F), mais se trouve retenu par la bougie Chamberland du type moins perméable (B). Cette propriété, de traverser certains filtres, permet d'obtenir aisément des cultures pures. Il suffit de diluer la sérosité virulente au 50e ou au 100e dans du bouillon-Martin et de filtrer, par exemple, sur bougie F ; on ajoute ensuite au filtrat dé 5 à 8 pour 100 de sérum de bœuf et on porte à l'étuve.

En bouillon-Martin-sérum, à 37°, apparaît, après 2 à 3 jours, une opalescence légère, quelquefois difficile à percevoir ; pour mieux s'assurer du développement du microbe, M. Dujardin-Beaumetz conseille d'inter-

poser, entre le tube de culture et la source lumineuse, un écran percé d'un trou : en agitant, on voit se mouvoir des ondes soyeuses. Les cultures deviennent de plus en plus opalescentes les jours suivants, ce qui tient simplement à la formation de précipités albumineux et phosphatiques (la même précipitation a lieu dans le bouillon-sérum non ensemencé). On peut remplacer le bouillon-Martin par du lait, digéré à l'aide de la pancréatine, puis chauffé à 80°, alcalinisé, stérilisé à la bougie Chamberland et additionné de sérum. Le bouillon ordinaire, fabriqué avec les diverses peptones du commerce, ne convient guère ; encore faut-il s'abstenir de le chauffer au-dessus de 70° pendant sa préparation (on le stérilisera donc par filtration). Il vaut bien mieux recourir au bouillon-Martin ; il est préférable de ne pas chauffer celui-ci à l'autoclave, mais on y est bien obligé, lorsqu'il s'agit de le transformer en gélose. Comme sérum, on peut employer celui des divers animaux et même celui des bovidés immunisés. Il existe cependant certaines différences, au point de vue de l'abondance des cultures ; le sérum de lapin se montre le meilleur de tous, le sérum de cobaye le moins bon. Le sérum de bœuf paraît préférable, pour la conservation de la virulence.

Sur la gélose au bouillon-Martin, recouverte de sérum, apparaissent, après 3-4 jours, des colonies très fines, qu'on ne voit bien qu'à la loupe et au jour frisant. Au microscope, elles se montrent transparentes et offrent un diamètre d'environ $0^{mm},2$. A partir du 5e jour, on y distingue deux zones, l'une centrale, formant un mamelon arrondi, brunâtre et granuleux, qui conserve ses dimensions de $0^{mm},2$; et l'autre périphérique, qui s'étale et peut, par son développement, donner à la colonie un diamètre total d'un millimètre. Cette colonie devient alors visible à

l'œil nu, sous forme d'un point blanchâtre. Si divers amas se rejoignent, il en résulte des placards festonnés, présentant plusieurs mamelons à leur surface. Ces mamelons appartiennent en réalité à la face inférieure des colonies, pénètrent dans le milieu et y fixent fortement le dépôt microbien, que le fil de platine ne peut détacher. *On réussit à colorer en masse les cultures sur gélose.* Pour cela, on peut abraser une mince tranche superficielle, que l'on fait sécher sur une lame. On teinte, pendant une heure, à l'hématéine (les couleurs d'aniline auraient une action trop brutale), puis on traite, durant un quart d'heure, par l'acide acétique au tiers. On lave à l'eau et on monte dans la glycérine. La colonie apparaît violette sur un fond transparent et le mamelon se montre plus foncé que le reste. En faisant, d'autre part, des coupes perpendiculaires au milieu, on constate nettement que ce mamelon est bien enfoui dans la gélose. Quand on « décalque » les colonies, en appliquant la surface de l'agar sur une lame de verre et en grattant ensuite le milieu au scalpel, on obtient des préparations que l'on peut colorer avec les matières basiques d'aniline ; on s'assure alors aisément qu'elles ne prennent pas le Gram. Ajoutons, pour terminer, qu'on n'arrive jamais à teinter les microbes disséminés dans les liquides (Dujardin-Beaumetz).

L'agent de la péripneumonie est surtout aérobie ; dans le vide, le développement se trouve retardé et reste maigre. L'optimum thermique est de 36°-38°, les limites extrêmes de 30° et de 42°. Le microbe meurt à 58°. La croissance offre son maximum entre le 5e et le 8e jour ; après un mois, le repiquage devient difficile. Si l'on garde les cultures, en ampoules scellées, à 10°-15°, la vitalité se maintient 10 mois et plus. Pour conserver la virulence, il faut faire des passages tous les 15 jours et ne pas laisser les tubes

à l'étuve plus de 6 à 8 jours. Le bouillon, ensemencé, devient moins alcalin ; si l'on a ajouté 5 pour 100 de glucose, lévulose ou maltose, il y a formation d'acide aux dépens des sucres, ce qui constitue un bon criterium du développement microbien (Dujardin-Beaumetz).

Les propriétés de la sérosité péripneumonique n'ont plus guère d'intérêt aujourd'hui, puisqu'on opère avec des cultures pures. Nous rappellerons seulement que l'acide phénique à 2 pour 100 n'atteint pas la virulence et que la lymphe, recueillie purement, se conserve 3 mois et plus en ampoules scellées.

Caractères d'inoculation.

Toutes les expériences, réalisées jadis avec la sérosité, ont été répétées avec les cultures et ont fourni les mêmes résultats.

Les bovidés sont seuls sensibles au virus, le lapin se montre sensible à la toxine (*ubi-infra*). L'injection intrapulmonaire ou intratrachéale immunise, sans engendrer d'accidents. L'ingestion ne produit ni l'infection, ni l'état réfractaire. L'inoculation intrapéritonéale détermine une péritonite exsudative, avec liquide abondant et fausses membranes. L'inoculation intraveineuse est bien tolérée, mais elle ne vaccine pas, contrairement à ce que l'on a répété pendant longtemps. Les animaux ne deviennent immuns que si un peu de virus, répandu en dehors de la veine, a déterminé une tuméfaction curable (Nocard et Roux). Tout récemment, MM. Nocard et Roux ont réussi à reproduire la maladie naturelle, en faisant inhaler aux bovidés des cultures liquides, pulvérisées à l'aide de l'appareil Guasco. L'injection intrapleurale provoque un épanchement pleural et périto-

néal. L'inoculation dans la chambre antérieure immunise, sans produire de réaction locale. L'injection intracérébrale, inoffensive pour les sujets immunisés, tue les animaux neufs ; après une incubation de 6 à 14 jours, se manifestent de la torpeur, des accès de vertige, souvent aussi une hyperesthésie cutanée générale et la mort survient plus ou moins vite. A l'autopsie, lorsque l'animal a succombé rapidement, on note de la pachyméningite, autour du point de pénétration de l'aiguille, un exsudat gélatineux dans l'arachnoïde et une infiltration séreuse du lobe inoculé. Le liquide céphalo-rachidien est riche en microbes (petits grains réfringents). L'exsudat et la matière nerveuse ramollie donnent des cultures positives. Quand la mort arrive plus lentement, on ne remarque qu'une infiltration fibrineuse le long du trajet de l'aiguille. Chez les veaux de lait, l'inoculation intracérébrale détermine, comme l'inoculation sous-cutanée (ou cutanée), l'apparition d'arthrites multiples et de synovites (Nocard et Roux).

L'inoculation sous-cutanée (ou cutanée) du virus, aux *bovidés adultes* est suivie, comme M. Willems l'a établi le premier, d'effets très différents, selon qu'on opère sur les *régions défendues* (tronc, partie supérieure des membres), ou sur les *régions permises* (extrémités des membres et queue). Nous avons déjà noté pareille différence, à propos du bactérium Chauvœi. 1° *Inoculation en région défendue.* — Après 8 à 25 jours, parfois davantage, apparaît un engorgement inflammatoire local, qui ne tarde pas à s'étendre et s'accompagne de fièvre (40°-41°). D'ordinaire, la mort survient en peu de jours, dans le coma. On trouve, à l'autopsie, que le tissu cellulaire est infiltré d'un liquide citrin, limpide, coagulable. Cette infiltration, qui peut équivaloir à plusieurs litres de sérosité, pénètre dans les muscles sous-jacents ; il peut

même se produire un exsudat pleurétique, avec dépôts fibrineux, si l'inoculation a été pratiquée au niveau du thorax. Jamais on ne rencontre de lésions des viscères et l'agent pathogène reste cantonné dans le liquide exsudé. Parfois, l'animal guérit et la sérosité se résorbe lentement ; une immunité solide s'est alors établie.

2° *Inoculation en région permise.* — (A la queue, par exemple.) Les accidents se montrent fort atténués et la mort n'arrive que dans moins d'un cas sur 100 ; mais quelquefois il se produit une nécrose de la queue, par suite de l'extrême tension des tissus infiltrés. Ce mode d'infection constitue l'excellent *procédé d'immunisation, découvert par M. Willems* (1852).

Lorsqu'on s'adresse aux *veaux de lait,* l'inoculation sous-cutanée (ou cutanée) n'est suivie que d'un engorgement local peu marqué ou même nul. Mais, du 15e au 20e jour, on voit apparaître des tuméfactions douloureuses au niveau des synoviales articulaires et tendineuses. Ces manifestations, plus ou moins généralisées, se terminent toujours par la mort. A l'autopsie, les cavités séreuses montrent un exsudat fibrineux, ou un mélange de liquide et de fausses membranes épaisses.

Nous devons dire ici un mot de la *culture en sac,* chez le lapin. Les sacs sont remplis de bouillon-Martin et ensemencés, puis déposés dans le péritoine. Après 10-15 jours, on les trouve remplis d'un liquide opalin et légèrement albumineux, qui contient les grains réfringents, caractéristiques du microbe de la péripneumonie. On peut faire aisément des passages. On voit alors, de temps en temps, certains animaux mourir intoxiqués par le poison qui diffuse à travers le sac. Après quelques passages, le virus paraît s'atténuer. Contrairement au lapin, le cobaye ne se prête nullement à la culture *in vivo.*

II. *Diagnostic bactériologique de la péripneumonie.*

Sur l'animal vivant, il ne saurait être question d'un criterium expérimental (Nocard et Leclainche). Peut-être pourrait-on s'adresser, dans certains cas, au jetage ou au produit d'une ponction pulmonaire. Du reste, la clinique suffit le plus ordinairement et la rigueur des mesures sanitaires ne laisse guère le loisir de s'attarder aux difficultés du diagnostic.

Sur le cadavre, les lésions sont caractéristiques. On s'attachera à recueillir le virus purement, quand on veut l'ensemencer ou l'inoculer sans recourir à la filtration. Pour cela, on puisera la sérosité dans les lacs lymphatiques sous-pleuraux ou bien, si la plèvre est trop épaissie, dans le tissu sous-pleural lui-même, ou le tissu interlobulaire. Dans ce dernier cas, on pratiquera une section nette de l'organe, avec un instrument flambé et on évitera de faire pénétrer trop profondément l'effilure de la pipette, pour ne pas rencontrer un lobe voisin, dont le contenu sanguinolent viendrait teinter la sérosité obtenue et la contaminerait fréquemment de germes étrangers. Le liquide, ainsi recueilli, sera cultivé en bouillon-Martin-sérum, puis inoculé, si cela est nécessaire. Afin d'éviter cette inoculation coûteuse et souvent gênante (par la présence d'un grand animal, qui doit être isolé, surveillé, puis détruit), on s'attachera à bien étudier les cultures. On pourra aussi repiquer sur gélose-sérum, pour avoir les colonies caractéristiques. Nous rappellerons, en terminant, qu'il est infiniment plus certain et plus commode de filtrer le virus, quand on se propose de le cultiver. On opérera alors comme il a été indiqué au début de ce chapitre.

III. *Inoculation willemsienne.*

Elle se pratique aujourd'hui avec les cultures pures. On en injecte 5 gouttes, au niveau de la queue et on obtient un engorgement plus constant et plus régulier qu'avec la sérosité, jadis employée. On note aussi que l'infiltration a moins de tendance à gagner la base de l'organe. Toutefois, on pourra se trouver encore dans la nécessité de suivre la *méthode ancienne.* Aussi croyons-nous devoir l'indiquer en létail.

Choix et récolte du virus. — On peut recueillir le virus dans le poumon malade lui-même (il faut rejeter absolument les poumons qui offrent des lésions gangreneuses ou suppurées). Voici comment on procédera. Sectionner l'organe avec un couteau stérile. Laver la surface de section à l'eau stérilisée. Avec un calpel stérile, creuser, en plein parenchyme, une cavité conique (ou « fontaine ») ; recouvrir cette cavité d'une soucoupe stérilisée. Recueillir le liquide qui s'accumule dans la fontaine, à l'aide de pipettes tériles, que l'on scelle et que l'on conserve à l'obscuité dans un endroit frais. Le virus reste ainsi actif pendant plus d'un mois, surtout si on le garde à la lacière. On recommande également de mêler, à volume de sérosité, 1/2 volume d'eau phéniquée 5 pour 100 et 1/2 volume de glycérine neutre ; puis e filtrer sur papier stérilisé et de conserver dans des acons stériles et bien bouchés.

On peut aussi inoculer un veau sevré, de 3 à mois, en arrière de l'épaule et recueillir aseptiquement le liquide qui s'accumule en grande abondance ans la lésion locale (Loir).

Technique de l'inoculation. — Elle se pratique à la ueue. On coupe les poils de l'extrémité de l'organe

(partie antérieure), sur une étendue de 10-15 centimètres. Puis, on savonne avec soin, on fait 2 à 3 incisions de 1/2 à 1 centimètre de long, intéressant tout le derme et, lorsque l'hémorragie s'est arrêtée, on dépose, dans chaque incision, quelques gouttes de sérosité virulente. On peut aussi faire usage du séton (méthode initiale de Willems), mais il n'offre aucun avantage sur l'incision profonde.

Suites de l'inoculation. — Les phénomènes réactionnels débutent, en général, du 13[e] au 15[e] jour. La région apparaît tuméfiée, chaude, douloureuse ; la peau prend une teinte violacée ; les plaies d'inoculation s'ouvrent et se transforment en ulcérations recouvertes de croûtes. L'engorgement s'étend plus ou moins, mais finit toujours par s'arrêter et disparaître ultérieurement. En même temps, se montrent de la fièvre et des phénomènes généraux, qui ne tardent pas à s'amender et à guérir. Après 15-30 jours tout est terminé.

Effets de l'inoculation. — Elle confère l'immunité. Celle-ci aparaît 2 à 3 semaines après l'inoculation. Le degré d'immunité est en rapport avec l'intensité de la réaction. On ne doit considérer comme réfractaires que les animaux qui ont présenté un engorgement manifeste. Les autres seront inoculés à nouveau au bout de 6 semaines. L'immunité dure au moins un an. Dans les régions très infectées on recommencera l'opération chaque année. Les lésions, consécutives à l'inoculation willemsienne, ne constituent aucun danger pour les animaux sains des mêmes étables.

Accidents consécutifs à l'inoculation. — Les uns sont dus à l'exagération de la réaction locale. L'engorgement se manifeste rapidement et la peau, livide, se recouvre de phlyctènes. La région se mortifie, devient insensible et froide. Il se produit ensuite u

bourrelet inflammatoire, puis un sillon de séparation, à la limite des parties nécrosées et l'élimination de la zone gangrenée aboutit à la guérison.

Les autres sont dus à l'extension de cette même *lésion locale*. L'engorgement gagne la base de la queue ; l'organe se mortifie, se crevasse et laisse écouler un liquide sanieux. La température s'élève au-dessus de 40°, les animaux sont abattus. Si un sillon de séparation se produit, l'élimination des parties malades est ordinairement suivie de guérison. Mais, si l'engorgement envahit les parties voisines, la mort devient fatale : la température atteint 41°-42°, le sujet montre tous les signes d'une profonde infection et succombe habituellement avant que l'œdème ait dépassé la région fessière.

Les phénomènes de réaction intense, avec perte d'une partie plus ou moins étendue de la queue, se manifestent dans 5-10 pour 100 des cas ; la mort n'atteint pas 1 pour 100.

Traitement des accidents d'inoculation. — Si la réaction locale s'exagère, on la combattra par des scarifications profondes, dirigées longitudinalement. Si l'œdème devient envahissant, on aura recours à la réfrigération locale (glace, immersion, irrigation continue) ; si celle-ci échoue, on emploiera les scarifications, les injections de solution de Lugol [eau 200 grammes ; KI 5 grammes ; I 2 grammes], ou les pointes de feu. Enfin, si l'envahissement progresse, on pratiquera l'amputation de la queue, au-dessus du bourrelet inflammatoire (on n'hésitera jamais devant cette amputation, toutes les fois que le 1/3 supérieur de l'organe est atteint).

IV. *Sérothérapie.*

MM. Nocard et Roux ont vacciné une vache par

la méthode de Willems (en employant les cultures). Puis, ils lui ont injecté, en 6 mois, sous la peau et dans le péritoine, 5 litres de culture. Le sérum de cette vache, ajouté au virus, le rend inoffensif, mais le mélange ne confère pas l'immunité. Il ne se produit là aucune action bactéricide, car le mélange cultive en bouillon-Martin. 40 centimètres cubes de sérum donnent aux bovidés une *résistance transitoire* contre l'infection péripneumonique. Enfin, plusieurs centaines de centimètres cubes de sérum (chauffé à 58°), injectés dans les veines des animaux, manifestent une *action curative* au début de la maladie expérimentale (inoculation en région défendue). Comme on le voit, la sérothérapie de la péripneumonie n'est encore qu'à son début, mais tout fait prévoir qu'elle est appelée à rendre de grands services.

FIÈVRE APHTEUSE

On sait que cette affection frappe les bovidés, le porc, le mouton et la chèvre et qu'elle est *transmissible à l'homme*. On n'a pas encore réussi à cultiver l'agent pathogène, mais M. Löffler a démontré qu'il est représenté par un *organisme excessivement petit* « invisible » et *susceptible de traverser le filtre Berkefeld*.

Nous étudierons successivement les principaux caractères du virus, le diagnostic bactériologique de la fièvre aphteuse, sa sérothérapie, encore bien imparfaite et l'inoculation de nécessité, qu'on est amené à pratiquer chez les bovidés, au cours des épidémies.

I. *Principaux caractères du virus aphteux.*

Le virus siège dans les vésicules, d'où il passe, par rupture de celles-ci, dans le jetage, la salive et le lait. Il siège aussi dans le sang, depuis le début de la fièvre jusqu'à l'éruption. MM. Löffler et Frosch ont réussi, en effet, à infecter le veau avec 50-100 centimètres cubes de sang, prélevé 20 à 28 heures après l'inoculation expérimentale ; le sang est donc peu riche en microbes. La lymphe des vésicules, diluée dans l'eau de conduite stérile, se montre toujours active au 1/5000e. Lorsqu'on se propose de la purifier, par filtration sur Berkefeld, il faut l'étendre *au* 50e, *avec de l'eau* ; si elle est moins étendue, ou mêlée à un liquide riche en colloïdes comme le bouillon-sérum, les germes sont arrêtés au passage (Nocard). Dans la glacière, la lymphe se conserve régulièrement 14 jours, fréquem-

ment 3 semaines, quelquefois 8 à 9 semaines ; mais alors le nombre des microbes diminue et il faut inoculer de fortes doses pour obtenir un résultat positif. Elle ne résiste que 12 heures à 37° et perd son efficacité après une demi-heure à 70° (et souvent à 60°). Si on la dessèche à 31°, elle cesse d'être virulente après 24 heures. Elle se conserverait mieux lorsqu'on l'additionne de ses 3/4 d'eau glycérinée (*aâ*) ou de solution physiologique (Löffler et Frosch).

Les bovidés sont très sensibles à l'inoculation, le porc également ; le mouton et la chèvre se montrent moins réceptifs. M. Hicker serait parvenu à infecter les jeunes chats. M. Löffler a vu des fox-terriers se contaminer au contact d'animaux qui avaient reçu un virus très actif. Pour obtenir un tel virus, il conseille de faire des passages par le cochon de lait ; c'est le moyen le moins infidèle.

Le mode d'infection le plus sûr, chez les bovidés et le porc, consiste dans l'injection intraveineuse. Après 24-48 heures, on voit survenir des vésicules, dans la bouche et sur les trayons (vaches laitières) ; un jour plus tard apparaît l'éruption interdigitale. L'inoculation dans le péritoine ou dans les muscles fournit des résultats positifs. Nous parlerons plus loin de l'infection par la muqueuse buccale. Les scarifications sur la peau ne sont suivies d'aucun effet. L'introduction du virus dans une phlyctène, produite par l'eau bouillante, ne donne la maladie que s'il y a eu rupture d'un petit vaisseau ; de même, pour l'inoculation sous-cutanée. En faisant avaler aux animaux des capsules de gélatine (qu'on introduit au fond du pharynx, pour éviter l'infection buccale), on reproduit l'affection (L et F). Enfin, Hertwig, Mann et Villain ont contaminé jadis les veaux, en leur administrant du lait virulent par la voie digestive.

M. Leistikoff aurait obtenu l'infection du mouton,

par inoculation de salive virulente; M. Löffler n'a pu réussir. Par contre, avec un virus très actif, il a infecté des chèvres, qui ont pu communiquer la maladie à d'autres chèvres par cohabitation.

La *transmission à l'homme* est démontrée par les épidémies bien connues de Lyon, de Douvres, etc. Elle succède quelquefois à l'inoculation directe, comme dans le cas des vétérinaires qui portent à leurs lèvres leurs doigts souillés de virus, mais, le plus souvent, elle reconnaît pour cause l'ingestion de lait infecté. Hertwig, Mann et Villain ont réalisé autrefois sur eux-mêmes ce mode d'infection.

II. *Diagnostic bactériologique de la fièvre aphteuse.*

L'affection est tellement caractéristique, par ses manifestations cliniques et son extension malheureusement trop facile, qu'il ne se pose guère pratiquement. D'autant que l'agent pathogène échappe à la culture et ne peut être inoculé aux animaux de laboratoire.

Au cas échéant, on recueillerait purement la lymphe des vésicules, en choisissant des lésions récentes du mufle ou des trayons, que l'on stérilise superficiellement à l'alcool absolu et dont on aspire ensuite le contenu (L. et F.); ou bien, on se contenterait d'un liquide plus ou moins souillé, qui serait filtré au Berkefeld, après avoir été étendu d'eau dans la proportion de 1/50e. Le virus pur serait inoculé dans les veines des bovidés ou du porc et, après un à deux jours, on observerait l'apparition des lésions caractéristiques.

III. *Sérothérapie (préventive) de la fièvre aphteuse.*

Elle n'a encore *aucune valeur pratique*. M. Löffler,

après avoir préconisé la vaccination des bovidés par un mélange de sérum et de virus, dit *séraphtine*, a dû y renoncer pour le moment, à cause de l'incertitude des résultats obtenus. Son procédé n'en reste pas moins intéressant au point de vue théorique et sans doute susceptible de perfectionnement. Avec M. Uhlenhuth, il a conseillé récemment l'emploi du *sérum seul chez les moutons et les porcs*; l'immunité, ainsi conférée, serait assez longue pour permettre aux animaux de traverser sans encombre la durée d'une épidémie. Selon la taille des sujets, on leur injecte 10 à 20 centimètres cubes de sérum; on injecte 5 centimètres cubes aux cochons de lait.

IV. *Inoculation de nécessité.*

Mise en œuvre pour la première fois par Buniva, elle doit être *toujours* pratiquée lorsque la maladie a envahi une étable, car la contamination de tous les animaux est alors devenue fatale. Aucun des moyens que l'on préconise périodiquement pour empêcher cette contamination n'a la moindre valeur; *il faut le dire et le répéter aux fermiers*. On infectera les bovidés en badigeonnant simplement la bouche avec de la salive virulente. Pour cela, on imprégnera de virus un linge rude et on frictionnera vivement la face interne des lèvres et la langue. Le 2° ou le 3° jour, survient une élévation thermique d'un degré à un degré et demi, puis on voit apparaître les vésicules caractéristiques qui, le plus souvent, restent localisées à la muqueuse buccale. *On réalise* donc, *d'ordinaire, la forme la moins grave de la maladie* nouvel avantage de l'inoculation de nécessité. On aura soin de *bien traiter les animaux infectés* artificiellement, ainsi que ceux qui ont pris l'affection naturelle. On pratiquera de fréquents lavages sur les parties malades; on suppri-

mera les aliments durs et on ne fera jamais prendre de force des aliments, même liquides, afin d'éviter l'introduction dans les voies aériennes (Nocard).

Rappelons, à titre prophylactique, l'usage de tubes trayeurs pour les mamelles malades et la nécessité de faire bouillir le lait contaminé. La *viande* des animaux atteints n'est *nullement dangereuse pour l'homme.*

HORSE-SICKNESS

Nous devons dire quelques mots de cette intéressante *affection des chevaux,* qui paraît propre à l'Afrique Australe. Elle sévit surtout pendant l'été et frappe presque tous les animaux récemment importés, dont le plus grand nombre périt. Les ânes résistent en général, la moitié des mulets succombent. Lorsqu'on fait rentrer les animaux, avant le coucher du soleil, dans une écurie bien close et qu'on ne les fait sortir, le lendemain, qu'après le lever du soleil, on arrive à les protéger contre la maladie. Particularité commune à la horse-sickness et au paludisme et qui semble bien indiquer que l'*infection s'opère par l'intermédiaire des insectes*. L'absence de contagiosité donne un nouveau poids à cette hypothèse. M. Edington, auquel nous devons à peu près tout ce que nous connaissons sur la maladie, a observé, *chez les moutons, les chèvres et les bœufs*, une *affection très analogue.*

La horse-sickness présente *deux types cliniques* L'un, appelé *dickopziekte* (forme à grosse tête), se caractérise par un œdème volumineux de la tête et de l'encolure, suivi de troubles respiratoires et d'un jetage mousseux, blanchâtre ou rosé, qui précèdent immédiatement la mort. Celle-ci est presque fatale. L'autre, appelé *dunpaardeziekte* (expression qu'on pourrait traduire par : forme latente), s'annonce seulement par un mouvement fébrile, qui échappe presque toujours à l'observation. Lorsqu'on s'aperçoit que l'animal est malade, la mort est déjà proche. Les troubles respiratoires et le jetage apparaissent à ce

moment et le cheval ne tarde pas à succomber, parfois en quelques heures. Les *lésions* sont *caractéristiques*. Au niveau des œdèmes de la dickopziekte, on trouve une abondante exsudation séreuse. Dans les deux formes cliniques, le péricarde présente un épanchement citrin ou rosé et les poumons sont infiltrés d'une sérosité, parfois si abondante, qu'elle forme des lacs sous-pleuraux et dissèque les lobules (comme dans la péripneumonie des bovidés). Enfin, le sang se coagule mal.

Le sang est constamment virulent, le liquide péricardique et le mucus trachéal ne le seraient pas toujours (Edington). Le sang peut conserver sa virulence jusqu'à 2 ans et 4 mois (Nocard). *Tous les modes d'inoculation reproduisent la maladie* chez le cheval, après une incubation de 8 à 9 jours. La mort survient le 5e ou le 6e jour de la fièvre. On peut obtenir la dickopziekte, en inoculant du sang dilué ou en s'adressant à des animaux partiellement immuns, mais on ne réussit pas constamment (Edington).

L'inoculation à l'âne tue rarement, donne parfois une affection légère et reste souvent sans effet. Sur 21 bœufs infectés expérimentalement, M. Edington en a rendu 7 malades ; parmi ces 7, 4 ont succombé. Il n'a réussi à déterminer, chez le mouton et la chèvre, qu'une affection purement fébrile et encore inconstamment. Les autres animaux se sont toujours montrés réfractaires.

Il est *impossible de vacciner sûrement les chevaux*. On y arrive parfois en leur inoculant du sang d'âne, de bœuf, de mouton ou de chèvre infectés ; ou en leur inoculant du sang citraté, conservé 10 jours à 39°. On y arrive parfois aussi, mais très péniblement, en injectant, à plusieurs reprises, des mélanges de sang virulent et de sérum de cheval hyperimmunisé. Nous ne pouvons entrer dans le détail de cette mé-

thode, demeurée encore imparfaite, malgré les recherches bien conduites et répétées de M. Edington.

M. Nocard a fait voir récemment que *le virus traverse la bougie Berkefeld, mais non la bougie Chamberland.*

Terminons en indiquant que le *piroplasma equi* semble affecter, avec la horse-sickness, les mêmes rapports que le piroplasma bigeminum avec la peste bovine (voir les chapitres : hématozoaires des animaux et peste bovine). C'est, du moins, ce qui résulte, pour nous, de la lecture de certains travaux.

PESTE BOVINE

Affection des plus graves, frappant les bovidés et certaines races de porcs, moutons et chèvres. On n'en connaît pas l'agent pathogène, mais l'étude expérimentale de la maladie, la vaccination et la sérothérapie ont fait l'objet de nombreux travaux dans ces dernières années.

I. *Principaux caractères du virus de la peste bovine.*

Nous l'appellerons, par abréviation, *virus pestique*, pour le distinguer du virus pesteux (de la peste humaine). Il se rencontre dans tous les tissus et toutes les humeurs des animaux qui ont succombé à l'affection. Il apparaît dans le sang, dès le commencement de la fièvre et peut persister jusqu'à 15 jours après le début de l'apyrexie chez les sujets guéris, comme l'un de nous l'a constaté avec le vétérinaire Adil-bey. Le sang se montre ordinairement actif au 500ᵉ de centimètre cube. Il est stérilisé à 55° et même à 52° (Nencki). A l'aide de chauffages ménagés, on n'affaiblit que très irrégulièrement le virus, ce qui ne permet pas de préparer ainsi des vaccins. La lumière détruit la virulence en quelques heures, la dessiccation à 31° après 4 jours (Koch) ; le sang, ainsi desséché, ne vaccine point. Les organes perdent leur pouvoir pathogène dans la glycérine, ainsi que dans l'acide phénique à 0,5 pour 100. Le sang, citraté à 3 pour 1 000, conserve ses propriétés, pendant au moins 12 jours, à 15°-18°, sous le volume de 200 centimètres cubes. Si

on incorpore 1 centimètre cube de sang défibriné à 5 centimètres cubes de gélatine et que l'on place le mélange à la glacière, il est encore infectieux après 32 jours, à la dose de 2 centimètres cubes (N et A). D'après Nencki, les organes des animaux pestiques demeureraient actifs pendant 1 à 3 mois dans l'eau salée à 10 pour 100.

Tout récemment, l'un de nous a démontré, avec le vétérinaire Adil-bey, que *le virus traverse la bougie Berkefeld et même la bougie Chamberland F.*

Les *bovidés* réagissent différemment suivant leur race. *La race grise est la moins sensible* de toutes, ou plutôt la moins régulièrement sensible ; les autres races se montrent plus ou moins réceptives. En Turquie, elles succombent *toujours* à l'infection expérimentale, mais leur sensibilité variable s'accuse nettement lors des épidémies et lors des applications sérothérapiques. C'est ainsi qu'il faut plus de sérum pour vacciner et surtout pour guérir les animaux des races perfectionnées qu'il n'en faut pour les bovidés plus rustiques. Les buffles semblent se comporter à peu près comme la race grise, au point de vue expérimental.

Tous les modes d'infection donnent des résultats identiques : on reproduit absolument la maladie naturelle, dont nous résumerons plus loin les caractères. L'injection intraveineuse a échoué une fois entre les mains de M. Kolle, sans donner d'immunité ; l'un de nous a noté le même phénomène, une fois également. L'inoculation par les muqueuses buccale et nasale, infidèle d'après M. Koch, serait cependant quasi certaine dans ses effets, d'après MM. Danysz et Bordet, dont l'opinion nous paraît exacte. La cohabitation constitue aussi un excellent moyen de contamination.

Certaines races de *moutons* se montrent assez sen-

sibles, par exemple dans les Indes ; on ne les tue pas cependant régulièrement (Rogers). Dans les Indes également, certaines races de *chèvres* succombent assez facilement à l'infection expérimentale, mais pas toujours (Rogers). Dans l'Afrique du Sud et en Turquie, le mouton résiste aux doses massives et ne présente même point constamment de la fièvre ; son sang est d'ordinaire virulent, du 3e au 10e jour, à la dose de 5 centimètres cubes environ (Kolle et Turner), mais il ne tue pas forcément les bovidés (N et A). En Turquie, la chèvre meurt souvent à la suite des inoculations, mais la mort ne survient parfois qu'à la longue ; les femelles pleines avortent toujours ; rarement on reproduit la maladie caractéristique. Le sang des animaux inoculés ne tue pas régulièrement les bovidés.

En Indo-Chine, le *porc* est facile à infecter (Carré et Fraimbault). Après 3 à 5 jours d'incubation, on note de la tristesse, des vomissements et des frissons. Les yeux sont chassieux, la salivation fréquente. Les muqueuses labiale et linguale desquament abondamment. Le 2e jour de la fièvre, apparaît une diarrhée jaunâtre, de plus en plus liquide. La mort n'est pas fatale ; quand elle survient, c'est du 7e au 16e jour. A l'autopsie, on observe quelquefois des ulcérations des gencives et des lèvres et toujours des ulcérations de l'estomac. L'intestin grêle se montre moins régulièrement atteint ; il est rare cependant que la plaque de Peyer, qui siège à la fin de l'iléon, ne soit pas tuméfiée et même érodée. Le gros intestin est toujours enflammé et fréquemment ulcéré. Les reins sont congestionnés, l'urine souvent sanglante. Enfin, on remarque de l'hypertrophie des ganglions mésentériques, de la congestion pulmonaire et, communément, de l'emphysème. Le sang tue les bovidés. En Russie, les porcs se montrent réfractaires.

Le *chameau* inoculé contracte, le plus habituellement, une affection curable, mais il peut succomber (Nencki, Tartakowsky). La *gazelle* se montre très sensible. Les animaux de laboratoire ne peuvent être infectés.

II. *Diagnostic bactériologique de la peste bovine.*

Les signes cliniques, très caractéristiques pour celui qui est familiarisé avec la maladie, pourraient prêter à confusion lorsqu'on ne l'a jamais observée et surtout lorsqu'elle surgit, à l'improviste, dans un pays indemne. Il est essentiel de les bien connaître. Ils sont les mêmes que ceux de l'affection expérimentale. Nous allons les rappeler avec quelques détails (d'après le travail de l'un de nous, en collaboration avec le vétérinaire Adil-bey). Disons auparavant que *le diagnostic bactériologique ne peut se baser que sur l'inoculation*. Celle-ci sera pratiquée avec le sang de l'animal malade ou avec le sang du cadavre. *Voici ce que l'on observera chez le sujet infecté* (par exemple sous la peau, avec un centimètre cube de virus frais). La fièvre, premier signe de la maladie, apparaît du 4° au 6° jour ; la température s'élève à 40°,5-41° et même davantage ; l'élévation est généralement brusque. Le 6° ou le 7° jour, se montrent de l'inappétence et le plus souvent de la constipation. Le 7° ou le 8° jour l'inappétence augmente et les signes caractéristiques se manifestent. L'animal est triste, les poils se hérissent, les yeux larmoient, une salive abondante s'écoule de la bouche. On constate, au collet des incisives un liséré congestif et, sur la face interne de la lèvre inférieure, de fines élevures blanchâtres. Le 8° ou le 9° jour, l'état général s'aggrave. Les oreilles restent tombantes, l'animal est abattu, indifférent et grince

fréquemment des dents. Les reins sont sensibles à la pression ; des tremblements musculaires se montrent au niveau des flancs et des muscles olécrâniens. L'anorexie est désormais complète. Dans la bouche, les élevures sont devenues confluentes et l'épithélium qui les recouvre se convertit, par places, en un détritus pultacé qui laisse, en s'éliminant, des érosions irrégulières à odeur fétide et à fond saignant. La conjonctive s'injecte ; les larmes, ordinairement muco-purulentes, coulent en abondance et agglutinent les poils du chanfrein. Un jetage, également muco-purulent, s'établit, déterminant des ébrouements. Enfin, la constipation fait place à une diarrhée intense, alimentaire, puis séreuse et souvent sanglante, d'une fétidité marquée. Le 9e ou le 10e jour, la température, qui s'était maintenue autour de 41°, commence à s'abaisser au-dessous de 40°. L'animal reste couché ; la stupeur et la faiblesse sont extrêmes. La diarrhée, profuse et incessante, épuise l'organisme. L'émaciation progresse à vue d'œil. L'hypothermie s'accuse de plus en plus et la mort arrive du 10e au 11e jour, rarement plus tard.

A l'autopsie on retrouve les lésions buccales déjà décrites. La pituitaire est congestionnée, parfois semée de pétéchies. Dans la caillette, on constate de la congestion (le plus souvent accompagnée d'un piqueté hémorragique), des taches purpuriques, des érosions et des altérations des follicules clos. Les taches représentent l'origine habituelle des érosions ; celles-ci sont tantôt linéaires (en coup d'ongle), tantôt polygonales, jamais arrondies ni festonnées. Les bords, taillés à pic, sont entourés d'une auréole hémorragique, le fond, pultacé tant qu'il reste trace de la muqueuse, devient sec quand il correspond à la couche musculaire. A côté de ces lésions ulcéreuses, on en trouve parfois d'autres, qui succèdent à l'infiltration des

follicules clos ; elles sont arrondies ou ovalaires et très profondes. Les altérations de la caillette prédominent toujours dans la zone pylorique. L'intestin grêle est congestionné ; on y voit souvent un piqueté hémorragique et même des taches pourprées, mais les ulcérations et les lésions des follicules clos sont peu communes. Dans le gros intestin, toutes ces altérations se rencontrent encore moins fréquemment. La rate n'est jamais hypertrophiée. Le foie présente un aspect spécial ; la surface de section, débarrassée du sang qui la recouvre, apparaît lisse, violacée avec un reflet vert jaunâtre. Elle est demi-transparente et ce caractère, joint à l'existence du reflet brillant, évoque l'idée d'un moulage en cire. La vésicule biliaire est remplie d'un liquide abondant, le plus souvent jaune verdâtre, clair, à peine filant. Les reins sont congestionnés. Les poumons montrent un emphysème discret des lobes antérieurs. Le sang se coagule lentement et incomplètement.

On évitera de choisir comme sujets d'expérience *les veaux âgés de moins de 6 à 8 mois,* qui peuvent succomber sans signes caractéristiques.

L'un de nous, avec le vétérinaire Adil-bey, a fait voir que *le virus pestique joue, vis-à-vis de la piroplasmose* bovine *latente, le rôle d'un* véritable *agent révélateur*. On sait que, dans les pays où règne cette affection (voir le chapitre piroplasmoses), les animaux indigènes jouissent d'ordinaire d'une immunité apparente. Ils recèlent cependant très souvent l'hématozoaire pathogène, car celui-ci apparaît fréquemment dans le sang, après inoculation du virus pestique ; il peut même se traduire alors par tout ou partie des signes classiques de la fièvre du Texas : fluidité du sang, qui noircit rapidement après la mort, hémoglobinurie, anémie suraiguë et dyspnée intense. A l'autopsie, les lésions de la piroplasmose

bovine compliqueront donc parfois celles de la peste : on notera alors l'hypertrophie de la rate, ainsi que l'aspect granuleux et la couleur jaune vif du parenchyme hépatique. Il faut être dûment averti que, *dans les conditions naturelles,* l'association des deux maladies n'est pas rare (au moins pour certaines régions). S'il y a peu d'inconvénients à ne pas voir la piroplasmose (souvent réduite au seul envahissement du sang par l'hématozoaire) derrière le typhus contagieux, l'erreur inverse entraînerait des *conséquences désastreuses,* surtout dans un pays indemne de peste bovine.

II. *Vaccination par la bile (Koch).*

C'est le seul moyen pratique d'immunisation, en dehors de la sérothérapie. Les autres procédés se montrent trop infidèles et n'ont jamais été appliqués en grand. On recueille la bile des animaux morts vers le 8e jour et on l'inocule, sous la peau, à la dose de 10 centimètres cubes. L'immunité est constituée après 6 à 10 jours et dure environ 4 mois. M. Bordet conseille, fort judicieusement, de n'employer la bile qu'après un séjour de 24 heures au frais. M. Edington préconise la bile glycérinée (bile 10 centimètres cubes + glycérine 5 centimètres cubes) ; nous pensons qu'on a été fort injuste à l'égard de cette méthode, qui offrirait, le cas échéant, de grands avantages. La vaccination par la bile ne saurait être employée aujourd'hui qu'en l'absence de sérum antipestique. Or, il est facile de se procurer de ce sérum, que l'on prépare couramment dans les pays contaminés.

IV. *Sérothérapie.*

On a jadis mis en œuvre le sérum des animaux

guéris (Danysz et Bordet), mais on ne se sert plus maintenant que du sérum des animaux hyperimmunisés, dont nous avons indiqué ailleurs la fabrication.

A. Préventivement. — On peut employer la vaccination par le sérum seul ou la vaccination par le sérum et le virus.

1) **Sérum seul.** — C'est le procédé exclusivement suivi en Turquie, où il a toujours donné des résultats excellents. Il offre l'avantage d'une extrême simplicité, mais aussi l'inconvénient d'une immunité transitoire. Toutefois, la pratique a démontré que l'état réfractaire dure *toujours* assez longtemps pour permettre au bétail de traverser, sans encombre, la période épidémique.

2) **Sérum et virus (méthode simultanée ou méthode Kolle et Turner).** — On injecte, d'un côté du corps, $0^{cc},5$ à 1 centimètre cube de sang virulent et, de l'autre, une dose variable de sérum, soit :

8 à 12^{cc}	pour les veaux	(Kolle et Turner.)
15^{cc}	pour les animaux de 300 kil.	—
20^{cc}	pour les animaux de 400-600 kil.	—
25^{cc}	pour les animaux de 600-800 kil.	—

Lorsque le sérum a été convenablement titré, on obtient une *affection purement fébrile*, bénigne, qui confère une résistance solide. On perd moins de 7 animaux sur 1 000 et, inversement, il n'y en a pas plus de 10 pour 100 qui ne réagissent point. Pour éviter l'emploi du sang de bœuf, qui peut contenir le piroplasma de la fièvre du Texas, MM. Kolle et Turner conseillent d'infecter un mouton. On lui injecte 50 centimètres cubes de virus et son sang peut être employé du 3e au 10e jour (à la dose de 5 centimètres cubes). Le mouton offre l'avantage de conserver l'agent pathogène, dans son organisme, pendant plusieurs jours, sans l'éliminer par ses sécrétions, c'est-à-dire sans pouvoir devenir une source de contagion.

Aussi, peut-il être infecté au laboratoire et envoyé dans les régions où l'on désire pratiquer les vaccinations.

Pour M. Rogers, il n'y a aucun rapport entre le poids des animaux et la quantité de sérum qu'on doit leur injecter, car, ce qui prime tout, c'est la *résistance individuelle*. M. Rogers attache une importance encore plus grande à la *question de race*. L'un de nous avait déjà constaté ces diverses particularités, qui rendent un peu délicate l'application en grand de la méthode Kolle et Turner. Enfin, M. Rogers préconise une inoculation de virus pur, 10 jours après l'emploi de la méthode simultanée, afin de consolider l'immunité des sujets qui n'ont pas réagi.

B. Curativement. — Le sérum donne des résultats d'autant meilleurs que la maladie est moins avancée, la race moins sensible et la forme moins grave.

Nous reproduirons, pour terminer et à titre de document pratique, les parties essentielles de l'instruction, formulée par l'un de nous, au sujet de l'application du sérum antipestique en Turquie.

INSTRUCTION POUR L'APPLICATION DU SÉRUM ANTIPESTIQUE

Prendre la température de tous les animaux de l'endroit contaminé. Ceux qui présentent une élévation thermique égale ou supérieure à 40° seront considérés comme *malades*, qu'ils aient ou non les signes classiques de l'affection. Ceux qui n'ont pas de fièvre seront considérés comme *suspects*. D'où deux modes d'intervention : préventive (traitement des suspects) et curative (traitement des malades).

Traitement préventif. — Parmi les suspects, il peut y avoir des sujets sains et des sujets en voie d'incubation : rien ne permet de les distinguer dès l'abord. Deux méthodes peuvent être appliquées aux suspects, quelle que soit leur race.

1° *Méthode générale*. — Injecter 25 centimètres cubes de sérum. Prendre la température le troisième et le cinquième jour (c'est-à-dire après deux fois et après quatre fois 24 heures). Si l'animal reste apyrétique, la vaccination est terminée. S'il mon-

tre, lors d'une des prises des températures, une élévation égale ou supérieure à 40°, on injectera une seconde dose de 25 centimètres cubes. Dans ce dernier cas, il est évident que l'animal était déjà en incubation au moment de la première intervention. (L'incubation de la peste bovine est, en moyenne, de 4 fois 24 heures.)

2° *Méthode d'exception.* — Si l'on se trouve dans l'impossibilité de suivre les animaux, on injectera 50 centimètres cubes de sérum en une fois et la vaccination sera terminée. Ce procédé simple et rapide a l'inconvénient de dépenser trop de sérum.

Traitement curatif. — La peste bovine confirmée offre pratiquement trois phases : période fébrile (fièvre et anorexie); période des lésions externes (conjonctivite, coryza, stomatite); période des lésions gastro-intestinales (diarrhée, puis algidité).

On emploiera des doses de sérum variables selon l'âge de la maladie et la race des animaux.

1re *période.* — Injecter une fois pour toutes :

Aux races moyennement sensibles (race grise de Roumélie).	100 cent. cubes.
Aux races sensibles (races noires d'Anatolie).	150 —
Aux races très sensibles (races de Crimée, Odessa, Alep, Égypte).	200 —

Les buffles sont assimilables, comme sensibilité, aux animaux de race grise.

2e et 3e *périodes.* — Injecter une fois pour toutes :

Aux races moyennement sensibles. . . .	200 cent. cubes.
Aux races sensibles.	250 —
Aux races très sensibles..	300 —

L'intervention à la troisième période est contre-indiquée en présence d'une diarrhée profuse, d'un état général trop grave et, naturellement, d'un début d'hypothermie (température égale ou inférieure à 40°). D'ailleurs, pour l'opportunité de cette intervention, le vétérinaire se basera sur la marche de l'affection, la sensibilité des races, la gravité de l'épidémie régnante et la quantité de sérum dont il dispose.

Remarques. — Dans les cas graves, l'injection intraveineuse est supérieure à l'injection sous-cutanée.

Les sujets soumis au traitement devront être protégés contre le froid et régulièrement alimentés (thé de foin, barbottages de farine, et même lait, s'il s'agit d'animaux de prix); au besoin on introduira directement les boissons dans le pharynx. Ces

soins constituent un complément important de la sérothérapie. Le traitement échouera le plus souvent chez les animaux déjà tuberculeux ou chez ceux qui sont atteints à la fois de peste bovine et de piroplasmose « clinique ».

Les doses prescrites pour le traitement curatif ont été *intentionnellement exagérées*. Lorsque le personnel vétérinaire sera complètement familiarisé avec la sérothérapie antipestique, nous indiquerons dans quelle mesure on peut les réduire...

CLAVELÉE

Affection *propre à l'espèce ovine* et dont l'agent pathogène est encore absolument inconnu à l'heure actuelle. Nous étudierons successivement les propriétés du virus claveleux, le diagnostic bactériologique de la clavelée et la clavelisation.

I. *Principaux caractères du virus claveleux.*

La virulence est limitée aux lésions et aux sécrétions souillées par celles-ci. La lymphe des pustules, ou *claveau,* se présente sous l'aspect d'un liquide clair comme de l'eau. Ce liquide, recueilli aseptiquement dans des ampoules scellées, demeure parfois actif plus de deux ans, lorsqu'on le maintient à l'abri de la chaleur et de la lumière ; il périt au contraire assez rapidement à la température de l'étuve. Si on le porte 3 minutes à 56°-58°, il perd sa virulence. Enfin, il résiste à la glycérine et à certains antiseptiques, lorsque la concentration n'en est pas trop forte (*ubi infra*). Les croûtes sèches conservent leur efficacité pendant 5-6 mois. Le claveau transmet encore la maladie quand il a été étendu au 1500e ; il contient donc beaucoup de germes.

Tout récemment, M. Borrel a montré que *le virus claveleux traverse la bougie Berkefeld et certaines bougies Chamberland, très perméables.*

Les diverses races de moutons se comportent fort inégalement vis-à-vis du virus. C'est ainsi que les moutons bretons se montrent réfractaires, les moutons

algériens peu réceptifs. L'inoculation, par scarifications, chez un animal de race sensible, détermine l'apparition d'une pustule volumineuse au niveau de chaque incision; l'éruption se généralise rarement. L'injection sous-cutanée engendre une tuméfaction locale et, le plus souvent, une éruption générale (du 6e au 8e jour); chez les adultes, le pronostic varie selon les sujets; chez les agneaux, la mort arrive communément du 14e au 20e jour. L'insufflation de claveau sec ou l'injection de claveau liquide dans la trachée reproduisent la maladie naturelle; c'est le plus sûr mode d'infection. L'inoculation intraveineuse est suivie d'un simple mouvement fébrile et confère l'immunité. L'inoculation intrapéritonéale provoque, d'habitude, une clavelée généralisée. L'introduction du virus dans la chambre antérieure amène l'éruption générale et la perte de l'œil; chez les animaux immuns elle reste sans effet. M. Nocard a montré que l'on ne peut transmettre l'affection par ingestion; les résultats positifs de certains auteurs sont dus à la pénétration accidentelle du virus dans les voies respiratoires (inhalation des aliments infectés lorsqu'ils sont secs, chute dans la trachée lorsqu'ils sont liquides. Le même auteur a inoculé pour la première fois le claveau dans l'encéphale du mouton. Il s'ensuit une maladie ordinairement mortelle. L'incubation est de 5-6 jours, comme d'habitude, puis survient une hyperthermie soudaine et très marquée qui annonce l'invasion. La mort arrive après 40 à 60 heures, le plus souvent au milieu d'accidents convulsifs. L'encéphale des sujets ainsi infectés se montre toujours virulent, le renflement brachial de la moelle une fois sur deux, le renflement lombaire jamais. L'inoculation intracérébrale n'occasionne aucun trouble chez les moutons immunisés, ni chez la chèvre et le lapin. L'espèce ovine est seule sensible à l'affection expérimentale, comme à la maladie naturelle.

II. *Diagnostic bactériologique de la clavelée.*

On recueille le virus, le plus purement possible, sur l'animal vivant ou sur le cadavre, comme il sera indiqué plus loin et on l'inocule dans la trachée d'un mouton pour obtenir l'affection type. On peut aussi inoculer un agneau sous la peau. Il faut, bien entendu, s'adresser à des races sensibles. Pour se procurer du claveau bactériologiquement pur, M. Nocard choisissait les nodules sous-cutanés qui peuvent apparaître au cours de la maladie naturelle ; malheureusement ils sont rares. La filtration, indiquée par M. Borrel, sera préférée désormais.

III. *Clavelisation.*

La *vaccination* de la clavelée par injection intraveineuse n'est nullement pratique. Nous laisserons de côté le *procédé* de *Duclert,* dont la valeur demeure contestable, puisque l'auteur opérait sur des races peu sensibles et le *procédé Pourquier,* qui n'est plus applicable, car le virus atténué, dont se servait l'auteur, a été perdu. Reste la *clavelisation, qui n'est pas* plus *une vaccination* que la variolisation, jadis employée chez l'homme. Elle confère, toutefois, une affection ordinairement peu sévère. Elle reconnaît *deux indications* principales : 1° lorsqu'un troupeau se trouve infecté, on pratiquera l'inoculation de tous les sujets encore sains pour abréger la durée de l'épidémie. La maladie est tellement contagieuse que peu d'animaux auraient chance de l'éviter ; comme, d'autre part, elle procède par « bouffées », on la verrait se prolonger pendant un temps parfois fort long. C'est ce qu'on nomme la *clavelisation de nécessité* ; 2° quand il s'agit

de races peu sensibles, il est indiqué d'en pratiquer la clavelisation systématique (ou *clavelisation de précaution*), surtout si les animaux sont destinés à être exportés dans des pays où les moutons n'offrent pas la même résistance. C'est ainsi qu'il y a lieu de claveliser le bétail algérien, au moins 50 jours avant son exportation en France. En Algérie, la clavelée sévit en permanence d'une façon si peu grave qu'elle est fréquemment méconnue ; ainsi rien n'est-il plus commun que de voir les moutons atteints de cette affection bénigne transmettre aux races françaises, ordinairement très sensibles, une clavelée plus ou moins sérieuse et en tous cas facilement évitable.

En France, on se sert, pour claveliser, de la lymphe fournie par les animaux naturellement infectés ; en Algérie, la production de cette lymphe est l'objet de soins spéciaux, comparables à ceux qu'on apporte dans la préparation du vaccin. On possède du claveau en permanence et en quantité toujours suffisante, grâce à des passages successifs, qui entretiennent le virus (sans renforcer toutefois son activité). Nous allons étudier brièvement la *production du claveau*, sa *récolte*, sa *conservation* et son *mode d'emploi*.

M. Soulié infecte un antenais vigoureux, sur un des côtés du tronc, en faisant 15 à 20 injections hypodermiques, chacune d'une demi-goutte de lymphe. Les piqûres restent distantes de 5 à 6 centimètres. Du 10e au 12e jour, on récolte le liquide interstitiel. On obtient ainsi 1 à 8 centimètres cubes de claveau par pustule et on a calculé que chaque mouton clavelifère pouvait fournir assez de virus pour l'inoculation de 20 000 sujets sains. M. Soulié étend la lymphe avec partie égale d'acides borique (3 pour 100) ou salicylique (2 pour 100). Il conserve le mélange au frais et à l'obscurité, en ampoules scellées. Au moment de l'usage, il dilue ce mélange au cinquième, avec les

mêmes solutions antiseptiques, puis étend cette dilution au dixième, avec de l'eau stérilisée. Il suffit de deux gouttes de cette dernière dilution pour claveliser un animal.

M. Brémond tue le clavelifère, énuclée les pustules par la face profonde et les broie selon la formule suivante :

Pulpe.	3	parties.
Eau boriquée.	6	—
Glycérine.	14	—

Il filtre après 6 jours et répartit en flacons bien bouchés.

Pour recueillir (et au besoin conserver) le claveau des animaux atteints de l'affection naturelle, on s'adressera à l'un ou l'autre de ces procédés, qui sont excellents tous les deux.

L'inoculation se pratiquera à la queue, ou mieux à la face interne de l'oreille, ce qui expose moins aux souillures accidentelles. On insérera le virus sous l'épiderme, à l'aide d'une lancette ou d'une aiguille cannelée, après section des poils et savonnage. Une piqûre suffit. Le 5e jour, apparaît une tache rouge, reposant sur une base tuméfiée ; le 7e jour, la tumeur atteint, en moyenne, l'étendue d'une pièce de deux francs ; le 8e jour, on note l'ombilication centrale ; le 9e ou le 10e, arrive la phase de sécrétion ; enfin, du 14e au 18e jour, la dessiccation est accomplie. Au 7e ou 8e jour, surviennent quelques phénomènes généraux, d'ordinaire bénins. La mort est rare en Algérie (1 à 5 pour 100) ; en France, selon les races, elle peut atteindre aussi peu d'animaux qu'en Afrique, ou bien frapper 1,5 et même 10 pour 100 du troupeau inoculé. Ces derniers chiffres sont heureusement exceptionnels.

Les animaux clavelisés seront isolés pendant au

moins 50 jours. S'il s'agit de bétail algérien destiné à l'exportation, on réinoculera, avec le virus claveleux pur, les moutons qui n'ont pas réagi, soit ordinairement 20 à 25 pour 100 (Soulié). Nous ne parlerons pas ici des complications septicémiques observées à la suite de l'emploi d'une lymphe mal recueillie, elles seraient aujourd'hui *impardonnables*.

En France, on ne clavelise pas les agneaux au-dessous de 4 mois ; en Algérie, on les clavelise souvent dès la naissance, ou bien on clavelise les brebis pleines (20 jours au moins avant la parturition), ce qui constitue un excellent moyen de conférer l'immunité au fœtus.

La *transmission* de la clavelée *à l'homme* ne paraît pas rigoureusement prouvée, malgré les observations de Villain et de MM. Bosc et Pourquier.

TEIGNES DES ANIMAUX

Le *favus* se rencontre assez fréquemment, comme nous l'avons dit ailleurs, chez le rat, la souris, le chat, le chien ratier ; plus rarement, chez le lapin et les oiseaux de basse-cour. Son diagnostic bactériologique se fera comme chez l'homme.

Certains *tricophytons* sont également communs à l'homme et aux animaux, tels les tricophytons ectothrix du cheval, du chat et des oiseaux (voir tondantes tricophytiques).

Enfin, le cheval présente trois *microsporons* et le chien un quatrième, retrouvé à Parme, dans une tondante rebelle de l'enfant (Mibelli et Bodin). Ces quatre champignons sont très voisins du microsporon Audouini de l'homme, dont il est difficile de les distinguer morphologiquement.

L'un des microsporons du cheval occasionne l'*herpès contagieux des jeunes poulains*, facile à reproduire expérimentalement. Le parasite fournit, sur gélose au moût de bière, un duvet blanc exubérant, sur gélose mannitée (3 pour 100) et peptonée (0,8 pour 100), un duvet moins abondant et sur pomme de terre, une culture peu duveteuse, accompagnée de coloration jaune du milieu. — Le second microsporon donne, sur gélose au moût de bière, des colonies ocreuses, sans duvet, sur gélose mannitée et peptonée, des cultures duveteuses et grisâtres et sur pomme de terre, des amas sans duvet accompagnés d'une coloration jaune rouge du milieu. — Le troisième microsporon est moins connu.

Le microsporon du chien (Bodin et Almy) fournit,

sur gélose au moût de bière, un duvet blanc, cerclé de jaune, sur gélose mannitée et peptonée, un aspect presque analogue et sur pomme de terre, un duvet blanc jaunâtre, avec coloration rouge du milieu. Le microsporon du chien donne au cobaye une affection type, mais bénigne.

AFFECTIONS ANIMALES DUES AUX BLASTOMYCÈTES

On connaît aujourd'hui plusieurs maladies des animaux, *soit naturelles, soit expérimentales,* qui sont produites par des levures. Comme type du premier groupe, nous décrirons la lymphangite épizootique du cheval et les phénomènes produits par le saccharomyces lithogenes. Comme type du second, nous citerons le saccharomyces neoformans et nous ferons remarquer que *le pouvoir pathogène n'est pas rare chez les blastomycètes,* puisque, sur 50 levures, Mlle Rabinowitch en a trouvé 7 virulentes pour les animaux.

Lymphangite épizootique du cheval.

Affection jadis confondue avec la morve ; on avait toutefois reconnu sa bénignité ordinaire, puisqu'on l'appelait *farcin curable.* Chenier en a montré le premier l'autonomie, à l'aide d'expériences précises. MM. Rivolta et Micellone ont découvert l'agent pathogène, qu'ils dénommèrent *cryptocoque.* M. Nocard a vérifié le bien-fondé de cette découverte.

Le saccharomyces pathogène se présente sous l'aspect d'une cellule à double contour, se reproduisant par bourgeonnement et prenant le Gram. Les cultures n'offrent pas de caractères bien spéciaux ; on notera toutefois la coloration grisâtre des colonies sur pomme de terre et l'absence de pouvoir fermentatif vis-à-vis des sucres.

La maladie est transmissible, par voie cutanée et sous-cutanée, au cheval, à l'âne et au mulet ; mais,

sans doute, faut-il réaliser certaines conditions spéciales, puisque plusieurs auteurs ont échoué. Dans les cas positifs, l'incubation est de 20 à 66 jours chez le mulet, d'un mois et plus chez l'âne et d'un mois environ chez le cheval. On voit apparaître, *loco læso,* un bouton farcineux, qui s'abcède et donne naissance à une ulcération atone, sécrétant du pus mal lié et concrescible. La plaie s'étend, la région envahie se tuméfie et on en voit partir des cordes farcineuses. Sur le trajet de celles-ci, naissent des abcès. Enfin, les ganglions se prennent à leur tour, comme dans l'affection naturelle. On n'a jamais réussi à infecter les plaies, artificiellement produites. Chez le cobaye et le lapin, le crytocoque détermine, par inoculation sous-cutanée, un simple abcès local.

Le *diagnostic bactériologique* est très important. Il ne se pose guère en France ; mais, en Algérie et en Italie, où l'affection n'est pas rare, il faudra se garder de commettre des confusions. L'épreuve de la malléine éliminera la morve. L'examen microscopique et les cultures distingueront aisément le saccharomyces du bacille de Preisz-Nocard. Le diagnostic avec la lymphangite gourmeuse est encore plus aisé.

Saccharomyces lithogenes.

Trouvé par M. Sanfelice dans les ganglions d'un bœuf mort de cancer du foie. C'est un *blastomycète type.* Il se montre capsulé dans l'organisme, où il émet çà et là des bourgeons. Ce qui le caractérise essentiellement, c'est la *calcification* (phosphate de chaux) qu'il est susceptible de subir. Il se développe dans les milieux ordinaires, alcalins ou légèrement acides. Il donne, en gélatine, des colonies blanches ; le milieu n'est pas liquéfié. Sur pomme de terre, on observe des cultures crémeuses, qui ne tardent pas à

brunir. Le cobaye, inoculé sous la peau, succombe au bout de deux mois, avec une tumeur locale et des métastases dans les organes. A la suite de l'inoculation intrapéritonéale, la mort survient en 20 à 30 jours. L'injection intra-hépatique détermine une lésion locale énorme. Dans l'organisme du cobaye et principalement dans le rein, on rencontre toujours des parasites calcifiés. La souris, inoculée sous la peau, meurt en 8 jours ; on trouve des nodules métastatiques et des parasites dans tous les organes.

Saccharomyces neoformans.

Isolé par M. Sanfelice *du jus de fruits* fermenté. Il se présente sous forme d'une cellule à double contour, qui s'entoure d'une capsule dans l'organisme. Il donne, en gélatine, des colonies blanches ; le milieu n'est pas liquéfié. Il se développe également sur gélatine acide. L'inoculation, sous la peau du cobaye, amène la mort en 30 jours ; les ganglions voisins du point d'inoculation sont pris et il se produit de nombreuses métastases viscérales, sous forme de granulomes. L'injection intrapéritonéale tue en 20 à 30 jours. Le péritoine est rempli d'un épanchement laiteux ; on trouve des nodules sur la séreuse et dans les viscères. L'injection intratesticulaire engendre une lésion locale intense, mais les métastases restent peu marquées ; la mort se produit en 25 jours. L'inoculation intra-oculaire peut déterminer des ulcérations cornéennes et de l'iritis. Le rat, infecté par la voie abdominale, succombe au bout de 8 jours à une véritable septicémie. On rencontre des parasites dans le sang et dans tous les organes. Chez le lapin, l'inoculation sous-cutanée demeure inoffensive. L'infection intrapéritonéale tue très irrégulièrement. Enfin, M. Sanfelice a observé deux fois la mort sur 30 chiens inoculés.

AFFECTIONS DES ANIMAUX DUES AUX HÉMATOZOAIRES ENDOGLOBULAIRES

M. Laveran classe les hématozoaires endoglobulaires en *trois groupes* : le genre *hemamœba,* le genre *piroplasma* et le genre *hemogregarina.* Nous ne nous occuperons pas des parasites de cette dernière catégorie, qui n'infectent que les animaux à sang froid ; ce sont d'ailleurs les plus imparfaitement connus.

Les *principales hemamœba* sont : l'*H. malariæ* (Laveran), dont nous avons donné la description à propos du paludisme — l'*H. relicta* (Grassi et Feletti) et l'*H. Danilewskyi* (G. et F.), parasites bien connus des oiseaux — l'*H. Kochii* (Kossel), parasite du singe — l'*H. Metchnikowii,* parasite d'une tortue de l'Inde (trionyx indicus), découverte par M. Simond, au travail duquel nous renvoyons le lecteur — et une H., trouvée par M. Dionisi chez les chauves-souris, mais insuffisamment décrite.

Les *principaux piroplasma* sont : le *P. bigeminum* des bovidés (Smith et Kilborne) — le *P. Kollei* (Kolle), rencontré également chez les bovidés — le *P. canis* (Piana et Galli-Valerio) — le *P. ovis* (Starcovici) — et le *P. equi* (Bordet).

Nous allons passer en revue les affections occasionnées par ces divers hématozoaires.

I. *Hémamoeboses.*

(A) Hémamoeboses des oiseaux.

H. relicta — (Proteosoma de certains auteurs).

Elle se présente, à l'état adulte, sous l'aspect de corps sphériques ou ovales, pigmentés, qui déplacent et refoulent le noyau des hématies. On rencontre, dans le sang, des parasites à tous les degrés de développement ; les formes jeunes sont dépourvues de pigment. Dans le sang et la rate, on trouve des corps en rosace, indices d'une multiplication endogène. Lorsqu'on examine à l'état frais une goutte de sang infecté, on voit que, parmi les parasites, les uns, correspondant aux éléments mâles, forment des flagelles susceptibles de se détacher et d'aller féconder les éléments femelles.

L'H. relicta, rare dans les pays du Nord, est fréquente en Italie et dans les Indes ; on la trouve notamment chez les moineaux de la Campagne Romaine. Le sang virulent, inoculé au *moineau* (dans le pectoral), reproduit l'affection ; tantôt celle-ci ne se traduit que par la présence du parasite dans les hématies, tantôt elle est accompagnée de signes graves et même mortels. L'incubation dure 4 jours ; le maximum de l'infection est atteint après 2 septenaires ; la guérison, quand elle survient, demande 3 ou 4 semaines. Les *canaris* sont très sensibles ; chez eux, la maladie est ordinairement plus sévère et évolue plus rapidement ; elle atteint son maximum en 8 à 10 jours et les parasites disparaissent au bout de deux semaines. Si, un mois après, on réinocule les animaux, 1/6 seulement prend une affection légère (Koch). D'*autres oiseaux* encore sont réceptifs. Les mammifères se montrent réfractaires.

L'H. relicta *évolue dans le corps de certains moustiques,* comme M. Ross l'a démontré le premier. Si l'on place, sous un filet, des oiseaux malades avec des culex femelles (*culex pipiens,* ou *nemorosus*), 10 à 1[illegible] heures après, les culex ont suçé le sang des oiseaux et on retrouve dans leur tube digestif les parasites en voi

de transformation. Les éléments femelles, fécondés par les flagelles des éléments mâles, se transforment en corps vermiformes, minces et allongés (*zygotes*), qui disparaissent après 48 heures; ils se sont enkystés dans la paroi de l'estomac, formant des boules pigmentées. Ces boules s'accroissent les jours suivants; on y voit naître des boules secondaires, à l'intérieur desquelles apparaissent des faisceaux de *corps falciformes*. Les corps falciformes deviennent libres, se répandent dans l'organisme, puis se localisent (vers le 9e-10e jour) dans les glandes venimo-salivaires. Il est donc évident que la maladie se transmet par les moustiques. La preuve expérimentale directe a été fournie par M. Ross.

H. Danilewskyi — (Halteridium de certains auteurs). Elle offre, à l'état adulte, l'aspect d'un corps cylindrique, disposé parallèlement au noyau de l'hématie, lequel conserve longtemps sa situation normale. Les extrémités sont souvent renflées. On n'observe jamais de formes en rosace. Quand on étudie, à l'état frais, une goutte de sang infecté, on voit les parasites devenir ronds; les uns (éléments mâles) produisent des flagelles qui se détachent et vont pénétrer dans les éléments femelles pour les féconder (Mac Callum, Marchoux, Koch). L'examen est aisé à pratiquer, car les phénomènes se passent très vite, même à la température ordinaire. Après 30 à 40 minutes, les éléments femelles fécondés prennent l'apparence de petits vers, généralement recourbés et peu mobiles. On ne peut pousser plus loin l'observation. On ignore aussi quel est l'insecte qui héberge le parasite dans les conditions naturelles. Bien plus, les inoculations échouent constamment. L'H. Danilewskyi infecte diverses espèces, notamment le *pigeon*, le *moineau* et le *calfat*. L'affection diminue de fréquence à mesure que l'on remonte des Tropiques vers le Nord (Laveran, Koch).

(B) Hémamoebose du singe.

Découverte sur la côte orientale d'Afrique. Les cer copithèques sont plus souvent atteints que les cyno céphales. Le parasite adulte est représenté par de corps sphériques pigmentés. On n'observe jamais d rosaces. *In vitro,* on a noté la différenciation en élé ments mâles et femelles. Enfin, l'inoculation au sing a constamment échoué. L'hémamoebose du sing semble revêtir un caractère à peu près latent.

II. *Piroplasmoses.*

(A) Piroplasma bigeminum.

C'est l'*agent d'une affection* qui paraît *répandu dans le monde entier* et à laquelle on a donné l noms les plus divers : fièvre du Texas, hémoglobinur du bœuf, tristeza, malaria bovine, mal de brou (France), etc. Elle se présente, tantôt sous une form bénigne et même latente, tantôt sous des formes grave voire foudroyantes (rupture splénique). L'hémogl binurie est loin de se montrer constante. On a no partout la *résistance des animaux indigènes,* contra tant avec la sensibilité des animaux importés.

I. *Principaux caractères, du P. bigeminum.*

L'aspect type est celui de *deux corps piriform* réunis par leur extrémité effilée. On trouve aussi d formes rondes. Les hématies contiennent de 1 à parasites. Le volume des hématozoaires, quel que s leur aspect, est très variable ; leur nombre égalemen Ils sont toujours endoglobulaires dans le sang, qu quefois libres dans la rate. Étudiés à l'état frais, leur reconnaît des mouvements amiboïdes. Colo

par la méthode de M. Laveran, ils montrent un noyau avec karyosome, qui se divise à un moment donné, précédant la scission du protoplasma (fig. 193).

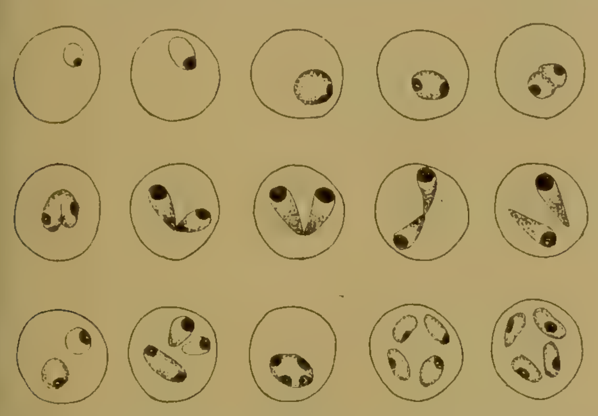


Fig. 193. — Globules rouges de bovidés, contenant le piroplasma bigeminum à différents stades de son développement (Laveran et Nicolle).

M. Lignières a annoncé qu'il était arrivé à cultiver le piroplasma dans du sérum de bœuf fortement hémoglobinique et à 37° ; il faut partir d'une semence très riche et on ne réussit pas toujours. Voici de quelles modifications s'accompagne le développement. Les parasites s'arrondissent, sortent des globules et perdent leur noyau. Puis, la masse nucléaire se reforme et se divise en 2 à 5 petits éléments qui deviennent libres après s'être entourés de protoplasma : ce sont les *spores*. Ces spores, ensemencées, reproduisent les corps sphériques, lesquels donnent à leur tour de nouvelles spores. On peut faire des cultures successives, sans altérer la virulence du piroplasma. Les mêmes modifications apparaissent dans l'estomac des *tiques*, lesquelles semblent bien représenter l'unique agent de contamination (Smith et Kilborne).

Le sang virulent conserve son activité pendant un temps excessivement variable (de 24 heures à 8 à 10

jours). Il infecte les bovidés par tous les modes d'inoculation, sauf la voie digestive. Mais les résultats obtenus se montrent des plus variables. Chez les *animaux indigènes*, on peut n'observer que la simple apparition des hématozoaires dans la circulation générale. Chez les *animaux importés*, on détermine une affection tantôt mortelle, tantôt curable; les *jeunes sujets* offrent une résistance bien connue. La maladie se traduit par de la fièvre, commençant du 5e au 8e jour, une anémie plus ou moins grave, une hémoglobinurie inconstante et, dans les cas mortels, une dyspnée très intense. Les lésions sont caractéristiques : rate molle, grosse, diffluente; reins congestionnés; sang fluide; bile abondante et épaisse. Le foie offre deux aspects différents; tantôt il est rouge brun et uniforme, tantôt il apparaît granuleux et jaune d'or et prend alors une teinte vert bronze dans le sublimé de Mayer (Nicolle et Adil bey).

La quantité de sang nécessaire pour réaliser l'infection varie essentiellement suivant le nombre des parasites et, sans doute aussi, leur activité. M. Lignières a parfois échoué avec 1 centimètre cube. Les espèces animales, autres que les bovidés, demeurent réfractaires.

II. *Diagnostic de la piroplasmose.*

L'*affection peut rester latente* chez les animaux indigènes; toutefois, nous avons vu, à propos de la peste bovine, que les hématozoaires latents envahissent fréquemment l'organisme lorsqu'ils sont « réveillés » par le typhus contagieux. Même chez les animaux importés, les signes cliniques manquent parfois de netteté, surtout quand l'hémoglobinurie fait défaut ou quand il s'agit des jeunes sujets. On pratiquera alors l'examen du sang, qui sera coloré de préférence au bleu polychromatique. La présence des « doubles poires »

est caractéristique. Il faut, dans certains cas, répéter les recherches pour rencontrer le parasite. De plus, lorsque la mort survient après 8-10 jours, ils ont parfois disparu. Indiquons, comme particularité curieuse, qu'ils peuvent être retrouvés dans le sang du cœur, alors qu'immédiatement avant de sacrifier l'animal ils faisaient défaut, malgré des examens multipliés, dans le sang de la jugulaire ; le fait n'est pas rare (N et A). On pourra compléter le diagnostic par l'inoculation (à des animaux importés), soit sous la peau, soit dans les veines.

III. *Propagation. Prophylaxie. Vaccination.*

La *maladie* semble *toujours transmise par les tiques* (ixodes bovis aux États-Unis ; ixodes reduvius en France ; rhipicephalus dans l'Argentine — Lignières). Les tiques femelles sucent le sang des bovidés atteints, puis elles tombent, pondent, une semaine (ou plus) après leur chute, et meurent. Les larves éclosent ensuite (au bout de 20-45 jours), se transportent sur de nouveaux bœufs et les infectent. Le parasite s'est donc transmis *héréditairement* d'une génération à l'autre (Smith et Kilborne, Pound, Hunt, Koch). Rien n'est plus facile que de vérifier ces faits, en recueillant des tiques gorgées de sang virulent et en les conservant dans une boîte, où leurs œufs écloront plus tard. Les jeunes tiques, placées sur des animaux neufs, les contamineront et la maladie apparaîtra après 12 à 18 jours. Il faut savoir que, par contre, les tiques ou leurs œufs, inoculés directement, se montrent inoffensifs.

Cette étiologie étant connue, quelle *prophylaxie* peut-on en déduire ? Il faut évidemment empêcher les troupeaux d'être envahis par les tiques et, pour cela, on les fera voyager de préférence en chemin de fer et pendant la saison froide. M. Lignières a noté, d'autre

part, que les luzernières sont contraires au développement des tiques. Il faudrait également débarrasser de leurs tiques les bovidés des régions infectées que l'on se propose d'exporter. Cette question a été étudiée en détail par les auteurs américains ; ils ont démontré qu'on y arrive à l'aide de divers bains, mais ces bains coûtent malheureusement trop cher.

La *vaccination* apparaît donc comme infiniment supérieure à la prophylaxie proprement dite. M. Lignières est arrivé à atténuer l'hématozoaire, par un procédé encore incomplètement décrit et il a obtenu des résultats excellents en inoculant ce virus atténué. Notons, pour terminer, qu'il n'admet pas l'efficacité thérapeutique de la *quinine* défendue par divers auteurs.

(B) **Piroplasma Kollei.**

Pour M. Lignières il s'agit d'une variété du précédent. Ce sont des éléments pâles, parfois presque aussi volumineux que les hématies et doués d'activité amiboïde à 37°. Leurs formes de reproduction sont inconnues. Ils ont été rencontrés en Afrique australe, où ils occasionnent une affection à marche lente, fébrile et mortelle dans la moitié des cas.

(C) **Piroplasma canis.**

Le parasite qu'a décrit M. Leblanc, dans un cas d'ictère infectieux du chien, diffère, par la présence de formes libres, de ceux que M. Marchoux a signalés au Sénégal et que MM. Nocard et Almy ont retrouvés à Paris. Le P. canis (Marchoux, Nocard) est tantôt rond, tantôt piriforme et bigéminé ; on peut voir jusqu'à 8 parasites dans une hématie. Le chien a été infecté par la voie intraveineuse ; on a fait naître ainsi chez lui une affection fébrile, avec hémoglobinurie.

Les expériences sont d'ailleurs encore peu nombreuses sur le sujet. *La maladie est vraisemblablement communiquée par les tiques.*

(D) Piroplasma ovis.

Parasite propre aux moutons. Décrit d'abord, en Roumanie, par M. Starcovici, dans la maladie nommée *carceag*, puis, en Italie, par M. Bonome dans un *ictère hématurique épidémique* des moutons. L'un de nous en a observé plusieurs cas à Constantinople. Les parasites sont ronds ou ovalaires et munis d'un noyau généralement périphérique (Laveran et Nicolle). On en trouve un ou deux par hématie infectée. Ils sont plus nombreux dans la rate que dans le sang. L'inoculation au mouton semble toujours échouer. On ignore quel est l'invertébré qui peut servir d'agent de transmission.

(E) Piroplasma equi.

Fréquent dans l'Afrique du Sud. Les parasites sont petits, généralement ronds ou ovoïdes, rarement piriformes. Les plus grands éléments possèdent un noyau facilement reconnaissable (Laveran). La maladie que détermine le piroplasma equi est encore mal connue.

AFFECTIONS CAUSÉES PAR LES TRYPANOSOMES

Dans le chapitre consacré aux maladies des animaux de laboratoire, nous avons mentionné, avec les détails nécessaires, les trypanosomes du rat, du cobaye, du lapin et des oiseaux. Nous étudierons maintenant le trypanosome de la dourine et ceux du nagana et du surra.

DOURINE

La dourine du cheval, ou maladie du coït, rare dans l'Europe centrale ou septentrionale, s'observe assez fréquemment en Espagne, en Turquie et dans l'Afrique du Nord. En 1892, M. Nocard montra que l'affection est inoculable au chien. En 1896, M. Rouget rencontra des trypanosomes dans le sang d'un cheval malade, en fit une étude très soignée et émit l'hypothèse de leur rôle pathogène. L'exactitude de ces prévisions a été prouvée par MM. Schneider et Buffard, qui ont retrouvé les trypanosomes dans d'autres cas de dourine et sont arrivés à reproduire expérimentalement la maladie chez le cheval.

I. *Principaux caractères du trypanosome de la dourine.*

Caractères morphologiques.

Dans le sang des animaux dourinés, le trypanosome (fig. 194) se présente sous forme d'une sorte

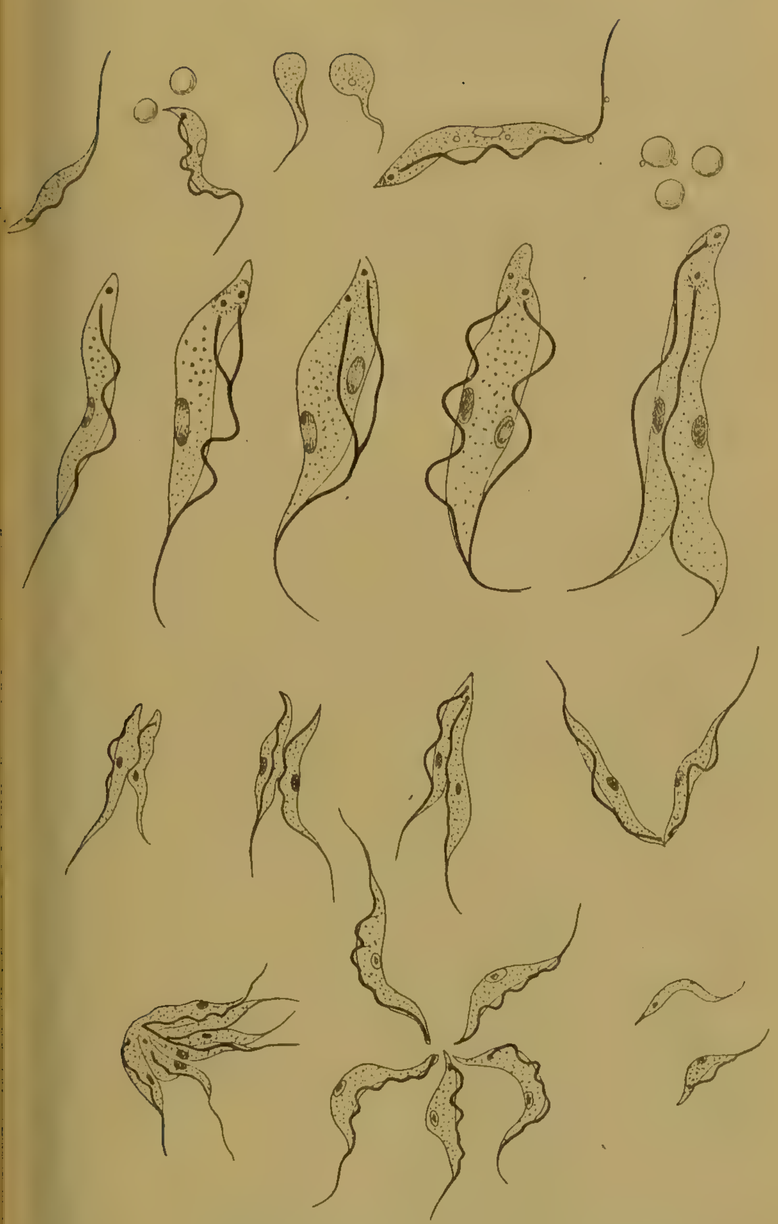


Fig. 194. — Trypanosome de la dourine (d'après Schneider).

d'anguillule, extrêmement mobile. En préparation lutée et à 36°, la mobilité persiste environ 48 heures. Le ralentissement des mouvements, qui se manifeste après 1 ou 2 heures, permet une observation plus complète. Le parasite paraît alors constitué par un fuseau protoplasmique, que limite, sur l'un des côtés, une membrane ondulante, offrant de nombreuses plicatures. Une des moitiés du corps dessine une sorte de bec, contenant une sphérule brillante ; l'autre moitié s'effile en un long flagellum et montre un corpuscule ovale, réfringent, plus volumineux que la sphérule dont il vient d'être question. La partie dépourvue de cil paraît bien être l'extrémité antérieure, car elle se contracte presque toujours la première et progresse de même (Schneider et Buffard). Les dimensions ordinaires du parasite sont de 25 à 30 μ de long, sur 2 à 3 μ de large. Une particularité curieuse est l'expulsion d'éléments figurés, qui naissent dans le corps même du trypanosome.

Le parasite se fixe souvent, par l'une de ses extrémités (l'extrémité qui ne porte pas le flagelle habituellement), sur un globule rouge, qu'il agite en tous sens. Après quelque temps de contact, il abandonne ce globule, évolue dans le plasma sanguin, puis attaque une autre hématie. La destruction des hématies est indiquée par les nombreux fragments et grains de pigment, rencontrés dans le champ du microscope.

Le trypanosome se colore fort bien par le bleu de méthylène et la thionine phéniquée. Si l'on s'adresse à la méthode de Laveran, on teinte très vivement, en rouge-violet, la sphérule (centrosome) et le corpuscule ovale (noyau), dont nous avons parlé et qui apparaissent entourés d'un halo clair. Le protoplasma prend un ton bleu foncé et montre de nombreuses granulations, surtout dans sa partie antérieure.

Les *essais de culture* dans les milieux les plus variés sont demeurés sans résultat.

Caractères d'inoculation.

D'après MM. Schneider et Buffard, les animaux sensibles à la dourine sont, par ordre de réceptivité décroissante : le cheval, le chien, le lapin, le rat, la souris, l'âne. Le cobaye et les oiseaux se montrent complètement réfractaires. Mais, comme l'a fait voir M. Nocard, il faut tenir grand compte de l'*adaptation* que les passages ont fait subir au trypanosome. M. Rouget, qui expérimentait surtout sur le rat et la souris, se trouvait avoir en mains un parasite très virulent pour ces espèces. MM. Schneider et Buffard, qui opéraient principalement chez le chien, ont fini par obtenir un parasite inactif pour le rat et la souris. M. Nocard, en inoculant ce dernier trypanosome dans le cerveau d'un jeune rat, est arrivé cependant à le tuer ; le microbe a pu être ensuite réadapté à l'organisme du rat, qu'il fait périr en 6 à 15 jours par la voie sous-cutanée.

Le *sang frais* d'un animal douriné constitue la *matière d'inoculation par excellence*. Les produits contenant du sang sont également virulents. Il en est souvent de même des produits de sécrétion de la muqueuse urétrale et du fourreau, de l'écoulement vaginal, de la chair musculaire, et de la substance médullaire prélevée au niveau des foyers de ramollissement. La maladie expérimentale est parfois obtenue, alors que la matière d'inoculation ne paraît pas renfermer de parasites à l'examen microscopique.

La dourine peut être transmise par la voie sous-cutanée (c'est la seule qui permette ordinairement de réaliser la symptomatologie intégrale), par les autres

voies habituelles (y compris le badigeonnage des muqueuses) et par le coït. La durée de l'incubation, la longueur de la maladie et l'acuité des symptômes dépendent étroitement de la quantité de trypanosomes injectés. Toutefois, dans une même espèce animale, il existe, d'un individu à un autre, des différences de réceptivité assez marquées. Ajoutons encore que chez toutes les femelles pleines l'*avortement* est fatal ; on ne trouve pas de parasites dans l'organisme du fœtus.

Chez la *souris blanche* (fig. 195-196), les trypano-

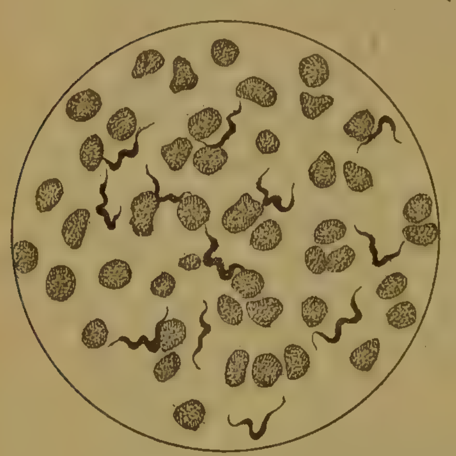


Fig. 195. — Trypanosome de la dourine. Sang de souris 4 jours après l'inoculation (d'après Rouget).

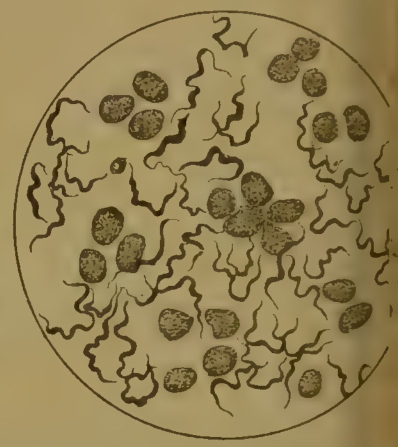


Fig. 196. — Trypanosome de la dourine. Sang de souris, 8 jours après l'inoculation (d'après Rouget).

somes apparaissent plus vite dans le sang après infection péritonéale qu'après infection sous-cutanée ; on peut déjà les rencontrer au bout de 36 à 48 heures. La mort survient du 5e au 11e jour. A ce moment, les parasites sont aussi abondants que les hématies. Les souris ne paraissent malades que quelques heures avant la mort. Elles se tiennent alors immobiles, les yeux clos, le poil sec et hérissé et présentent souvent des opacités cornéennes. A l'autopsie, on trouve la

rate hypertrophiée et les viscères congestionnés. Les trypanosomes se montrent partout très nombreux. La *souris grise* et le *rat blanc* succombent en 15 jours.

Chez le *lapin*, on observe des poussées fébriles, sans rapport avec l'apparition du parasite dans le sang. Les oreilles sont chaudes, œdématiées, tombantes. L'œdème persiste une ou plusieurs semaines, puis se montrent des troubles trophiques et des escarres. A la dernière période, on constate des parésies des membres postérieurs et même des sphincters, de la conjonctivite muco-purulente et parfois du jetage. Les organes génitaux peuvent présenter des œdèmes, des ulcérations, des nécroses. La mort survient au bout d'un à 4 mois. A l'autopsie, les ganglions lymphatiques se montrent tuméfiés. On observe des parasites partout. De même que chez le chien et le cheval, le trypanosome n'est rencontré dans le sang, pendant la vie, que par intermittences. Lorsqu'il y fait défaut, on le trouvera dans la rate, les milieux de l'œil, les plaques d'œdème, ou encore à la surface des muqueuses, mais jamais dans la moelle des os.

Le *chien* peut être infecté par scarifications ; la voie sous-cutanée est toutefois préférable. Si l'on introduit le virus sous la peau de l'abdomen, on observe, localement, une tuméfaction chaude, qui s'étend au bas-ventre, aux organes génitaux et aux régions inguino-crurales. Puis, apparaissent des troubles de la locomotion, des œdèmes localisés, de l'amaigrissement et des plaques, dont les dimensions varient entre le diamètre d'une pièce de 2 francs et celui de la paume de la main. Les manifestations oculaires (opacités cornéennes et cristalliniennes, conjonctivite purulente, kératite ulcéreuse avec hypopion) sont fréquentes. Enfin, l'animal se cachectise, au point de ne plus représenter qu'un squelette ambulant. La

mort arrive presque toujours subitement. A l'autopsie, on trouve une légère infiltration séreuse sous la peau du ventre et de la face interne des cuisses. Les ganglions inguinaux sont tuméfiés, les testicules atrophiés. La moelle est légèrement ramollie dans la région dorso-lombaire. L'évolution de la maladie se montre plus rapide, quand l'animal a été inoculé dans les veines ou dans le péritoine.

Chez les *équidés* (Schneider et Buffard), il n'y a aucune espèce de distinction à établir, soit au point de vue des symptômes, soit au point de vue des lésions, entre la dourine expérimentale et la dourine naturelle. Nous n'insisterons donc pas.

II. *Diagnostic bactériologique de la dourine.*

Il sera assuré par l'*examen microscopique* et les *inoculations*. *Sur le vivant*, on s'adressera, autant que possible, au sang des plaques et des engorgements. Si ceux-ci sont récents, il est en général aisé d'y trouver les parasites. On se souviendra toutefois que la sérosité, qui s'écoule des incisions, en est dépourvue et qu'ils n'apparaissent qu'avec le sang lui-même. Le sang de la circulation générale montrera plus rarement des trypanosomes, surtout à la fin de la maladie, alors que les plaques et engorgements ont disparu. En présence de tout examem négatif, on aura soin de ne pas négliger l'inoculation, moyen de diagnostic infiniment plus sensible que l'étude histologique.

Le microbe de la dourine peut aussi être décelé dans le sperme, le lait, les sécrétions vaginales et à la surface des éraillures de la vulve et de la verge. Il n'y est jamais aussi constant que dans les plaques récentes.

Après la mort, les parasites périssent très vite. Aussi,

pour être suivies d'effet, les recherches *post mortem* doivent-elles être entreprises hâtivement.

NAGANA

Ou « maladie de la mouche tsé-tsé ». Dû au *trypanosome de Bruce* (fig. 197). Ce trypanosome est assez voisin de celui de la dourine (MM. Laveran et Mesnil ont cependant indiqué quelques faibles différences morphologiques) au point qu'on s'était demandé jusqu'ici si les deux maladies n'étaient pas

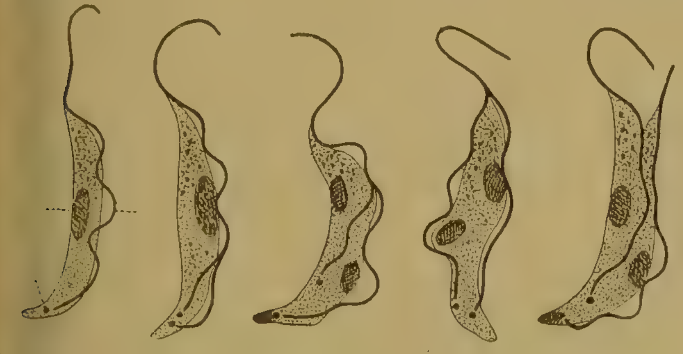


Fig. 197. — Trypanosome du nagana (Laveran et Mesnil). Division longitudinale.

identiques. M. Nocard l'avait pensé tout d'abord, malgré les différences qui séparent la dourine du nagana, mais il a dû modifier son opinion, après avoir constaté que les chiens, fortement immunisés contre la dourine, succombent à l'inoculation du trypanosome de Bruce.

Voici d'ailleurs en quoi la dourine diffère surtout du nagana : elle n'existe, *comme maladie naturelle*, que chez les équidés et ne se transmet que par la copulation ; elle dure bien plus longtemps que le nagana ; enfin, elle ne peut être communiquée ni aux ruminants ni aux singes.

Le nagana atteint le cheval, l'âne, le mulet, le bœuf, le chien, le chat et divers mammifères sauvages. Le virus est convoyé par la *mouche tsé-tsé (glossina morsitans)*, qui transporte la maladie, des animaux sauvages aux animaux domestiques. Lorsque les animaux sauvages disparaissent, le nagana disparaît également (Bruce). Le trypanosome ne paraît pas évoluer chez la glossine, car la piqûre de celle-ci cesse d'être dangereuse peu de temps après qu'elle a suçé le sang virulent. Si l'on infecte, en effet, des chiens avec des mouches recueillies 12 à 48 heures auparavant sur des sujets malades, l'incubation est déjà différée de 14 à 32-38 jours (Bruce).

Expérimentalement, on contamine sans difficulté les divers animaux indiqués et, de plus, le lapin, la souris, le rat, le hérisson, la chèvre, le mouton, le cobaye et le macaque ; le porc est également sensible (Laveran et Mesnil, Bradford et Plimmer). On peut s'adresser aux modes d'inoculation les plus variés ; toutefois, l'ingestion est infidèle et la transmission par le coït échoue toujours. Les symptômes observés sont : de l'émaciation, de la faiblesse, de la fièvre, des œdèmes (qui manquent chez le rat, la souris et le cobaye) et des lésions oculaires. La maladie dure un temps variable ; elle tue le chien en 14 à 26 jours, le chat en 22 à 26, le rat en 6 à 28, la souris en 8 à 2[illegible], le lapin en 13 à 58 et le cobaye en 30 à 183 (Kanthack). Le cheval périt en une ou plusieurs semaines. A l'autopsie des divers animaux, on note une adénie généralisée, de l'hypertrophie, presque constante, de la rate et de l'adipose hépatique ; chez le cobaye toutefois, les lésions sont ordinairement peu accusées. Le sang contient des trypanosomes, à partir du début de la fièvre jusqu'à la mort, mais d'une façon fort irrégulière. *In vitro,* il ne demeure virulent que quelques jours ; desséché, il perd très vite son activité

SURRA

Affection étudiée dans l'Inde par M. Evans. Pour MM. Koch, Nocard et L. Rogers, elle est identique au nagana. MM. Laveran et Mesnil font quelques réserves, justifiées par les différences d'action sur les bovidés et l'état imparfait de nos connaissances sur la morphologie du typonosome du surra.

QUATRIÈME PARTIE

APPLICATIONS HYGIÉNIQUES

CHAPITRE I

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DES EAUX

(A) *Analyse bactériologique.*

Elle comprend : le prélèvement de l'échantillon, son transport, puis l'analyse quantitative et qualitative des germes qu'il renferme.

1° Prélèvement de l'échantillon.

Le principe, qui doit guider au cours de cette opération, est la nécessité de *ne pas introduire de germes étrangers* dans l'échantillon prélevé. On choisira un flacon de 125 à 150 centimètres cubes. On le lavera soigneusement, on le laissera sécher, on l'obturera à l'ouate et on le stérilisera au four Pasteur. Un bouchon de liège, s'adaptant exactement au flacon, est stérilisé d'autre part, après avoir été entouré de papier.

L'opération du puisage varie un peu, suivant que l'eau doit être recueillie à un robinet, à la surface

d'une rivière, d'un puits, ... ou à une certaine profondeur. S'il s'agit d'un robinet, on l'ouvre et on laisse couler l'eau pendant quelques minutes, afin que l'analyse ne porte pas sur la portion du liquide qui a stagné dans les conduites; on approche ensuite la bouteille, tenue sous une certaine obliquité; on remplit et on ferme avec le bouchon stérilisé. S'il s'agit d'une rivière, il faut éviter de recueillir l'eau trop près du bord, où elle est plus riche en microbes. A l'aide d'une ficelle, on lance le flacon à une certaine distance, en prenant soin, au cas échéant, de ne pas soulever de limon. Parfois, avons-nous dit, c'est à une profondeur déterminée qu'il faut puiser l'eau. On s'adressera alors à des appareils spéciaux. Un des meilleurs est celui de M. Miquel (fig. 198). Il se compose d'une armature métallique, lestée avec du plomb et suspendue par une corde graduée en mètres. On y introduit un matras stérilisé, dont le col, effilé et recourbé, a été fermé à la lampe. A ce col, s'adapte une seconde corde, terminée par un anneau qui entoure l'effilure du matras. L'ensemble est descendu dans le puits, la rivière, etc... Quand on est arrivé à la profondeur voulue, on donne un coup sec à la corde qui commande l'anneau. Le col du matras se brise et l'eau pénètre dans le récipient. On remonte le tout et on ferme l'effilure à la lampe.

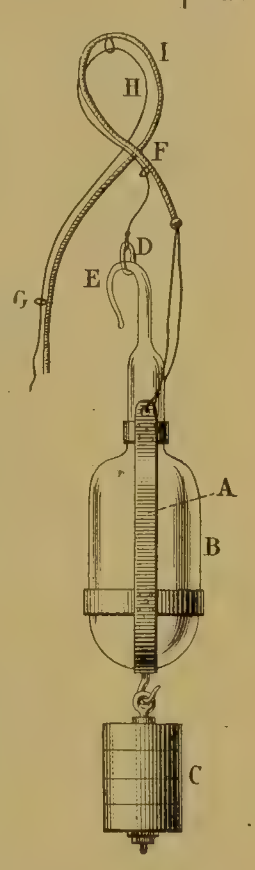


Fig. 198. — Appareil de Miquel, pour puiser l'eau à diverses profondeurs.

2° Transport.

Le point essentiel, ici, est de *s'opposer au pullulement des germes*. De nombreux faits (les premiers en date sont ceux de M. Miquel) prouvent que, dans l'eau soustraite à ses conditions ordinaires, les microbes se multiplient, même à la température ambiante, avec une extrême rapidité. Nous n'en citerons qu'un exemple. De l'eau de la Vanne qui, aussi-

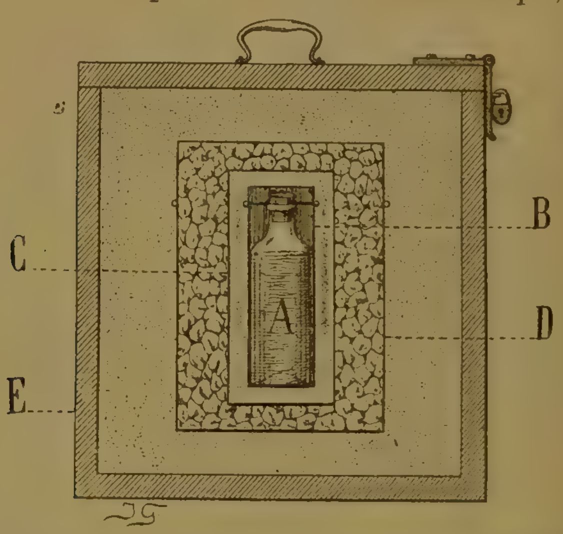


Fig. 199. — Caisse de Miquel, pour le transport des échantillons d'eau.

tôt puisée, renfermait 48 bactéries par centimètre cube, en contenait 38 600, après avoir été laissée 24 heures sur la table du laboratoire. La réfrigération permet d'atténuer cet inconvénient, dans des limites pratiquement suffisantes. Le moyen n'est pas parfait à vrai dire, car le froid tue certaines espèces et permet le développement de certaines autres. L'échantillon d'eau sera donc transporté au laboratoire, entouré de glace. M. Miquel a imaginé, dans ce but, un appareil très commode (fig. 199).

Si on ne le possédait pas, on pourrait y suppléer facilement à l'aide du dispositif suivant. Le flacon, cacheté à la cire et étiqueté, est introduit à frottement dans une boîte cylindrique en fer-blanc. Une deuxième boîte, en fer-blanc, également, mais de dimensions plus considérables (une boîte à palmers, ou un bidon à pétrole font parfaitement l'affaire), est remplie de glace concassée et contient, en son centre, l'échantillon entouré de sa gaine métallique. Dans les interstices des fragments de glace, on verse de la sciure de bois. Enfin, l'ensemble est renfermé dans une caisse de bois, encore plus grande que la boîte précédente ; l'intervalle est comblé exclusivement par de la sciure. Il va de soi qu'on doit éviter la congélation, qui serait susceptible d'amener l'éclatement du flacon. Ainsi disposé, l'échantillon sera transporté au laboratoire, par la voie la plus rapide. On y procédera, le plus tôt possible, à son analyse ; sinon, il faudra de toute nécessité le maintenir dans la glacière.

3° Analyse quantitative.

La numération des germes sera toujours précédée d'un *examen physique* rapide, destiné à renseigner sur la limpidité de l'eau, sur la présence ou l'absence de dépôt, etc... Elle comprend deux opérations successives : la *dilution* et l'*ensemencement*. L'ensemencement, pratiqué jadis dans les milieux liquides (Pasteur, Miquel), se fait toujours aujourd'hui dans la gélose, ou plus souvent, la gélatine (Koch, Miquel).

Nous avons *déjà indiqué*, à propos de la séparation des microbes, *une excellente méthode d'analyse* quantitative des eaux. On se rappelle qu'elle est basée sur l'usage d'une pipette, qui débite 50 gouttes par centimètre cube. Voici un *autre procédé*, couramment

mis en usage par l'un de nous et qui permet de déterminer si une eau contient plus ou moins de 1 000 germes par centimètre cube, c'est-à-dire si elle est, d'après M. Miquel, *quantitativement* pure. A l'aide de 3 tubes, contenant chacun 9 centimètres cubes d'eau stérile et de 3 pipettes d'un centimètre cube, on fait une dilution au 10^3 de l'eau suspecte. Pour cela, on verse 1 centimètre cube d'eau dans le premier tube ; on agite, on transporte 1 centimètre cube du mélange dans le second tube et ainsi de suite. Finalement, on ensemence, à l'aide d'une pipette graduée, 12 fioles de Gayon, contenant de la gélatine (à 15 pour 100), à raison d'un demi-centimètre cube de la dilution au 10^3 par matras. On fait faire prise et on place les flacons à l'étuve à 22°. On surveille le développement des colonies, en les marquant au fur et à mesure de leur apparition. *Après 15 jours, l'analyse est terminée.* On compte les germes développés dans les 12 fioles et on prend la moyenne. En doublant cette moyenne (puisqu'on a ensemencé un demi-centimètre cube seulement), en la multipliant par 10^3 et en ajoutant 20 pour 100 (proportion des germes susceptibles de pousser encore après 15 jours, d'après les nombreuses analyses de M. Miquel), on obtient un chiffre qui représente la richesse en microbes d'un centimètre cube de l'eau examinée.

Au lieu de rechercher simplement si l'eau contient plus ou moins de 1 000 germes par centimètre cube, *on peut* parfaitement, à l'aide de la méthode indiquée, *réaliser les numérations les plus exactes.* Pour cela, on fera d'abord un essai préliminaire, sur l'échantillon conservé dans la glacière, ou bien on multipliera les dilutions. Une certaine pratique des analyses, ainsi que des renseignements suffisants au sujet de l'eau examinée, simplifieront beaucoup la besogne. On

peut compter, à ce dernier point de vue, qu'une eau de source (pure) contient de 1 à 100 germes par centimètre cube; que la même eau, souillée par les pluies, en montrera de 100 à 1 000; que les eaux des rivières peuvent renfermer de 10 000 à 100 000 germes; qu'une eau d'égout en présente des dizaines de millions, et qu'enfin, avec les eaux ménagères, on arrivera à des centaines de millions.

Nous ferons observer qu'on ne peut suivre le développement des colonies dans la gélatine que si celles-ci sont assez peu abondantes et pauvres en liquéfiants. Sinon, il faut interrompre prématurément l'analyse et, plus on l'interrompt vite, plus les chiffres obtenus se trouvent, bien entendu, éloignés de la vérité. Mais, même dans les cas favorables, *les méthodes courantes sont* encore *fort imparfaites* et ne valent qu'à titre comparatif. Elles ne donnent aucun renseignement sur les anaérobies, sur les microbes poussant au-dessus de 22°, *a fortiori* sur les thermophiles. Elles ne révèlent pas la présence de divers pathogènes, de certains zymogènes nécessitant des milieux spéciaux, etc...

Dans les saisons ou climats chauds, la gélose-gélatine se trouve souvent indiquée. On peut aussi, en toute saison, s'adresser à la gélose. Elle est indispensable pour les essais préliminaires, dont il a été question plus haut et qui doivent être faits à 37°. Pour les analyses proprement dites, elle offre l'inconvénient d'être moins maniable que la gélatine. Sa propriété, de ne pas être digérée par les espèces liquéfiantes constitue à la fois un inconvénient et un avantage. Il en va de même pour sa propriété de permettre la culture à 37°, car certains germes des eaux, habitués à une basse température, ne poussent point à celle du corps humain. Il y aurait d'ailleurs intérêt à être mieux fixé qu'on ne l'est actuellement sur les avan-

tages et inconvénients respectifs des températures de 22° et de 37°.

Disons en terminant que la *présence de moisissures,* dans les flacons ensemencés, indique presque à coup sûr une contamination accidentelle par les poussières, au cours des manipulations. Il faut absolument éviter les moisissures, car elles ont une tendance bien connue à envahir tout le matras et liquéfient fort souvent la gélatine.

4° Analyse qualitative.

Les eaux contiennent toujours des *espèces saprophytes* et souvent des *espèces pathogènes*. Parmi les saprophytes, on rencontre des cocci, des sarcines, des bacilles, des vibrions, des spirilles, des streptothrix, dont l'énumération, interminable, serait absolument dénuée d'intérêt. Mentionnons seulement que certains de ces organismes sont caractérisés par des propriétés thermophiles, frigoriphiles, zymogènes, chromogènes, etc... (Miquel). Parmi les pathogènes, nous citerons : les staphylocoques, les streptocoques, les tétragènes, le b. coli, le b. typhique, de nombreux représentants du groupe coli-typhique, le proteus, le pneumo-bacille de Friedländer, le b. pyocyanique, etc. Le b. tétanique et le vibrion septique se rencontrent dans la vase, plutôt que dans l'eau elle-même.

Pour isoler ces diverses espèces, on peut s'adresser aux *séparations* en gélatine ou en gélose, mais l'opération est d'ordinaire hérissée de difficultés. Il faut en effet multiplier les plaques et se livrer à des examens systématiques et répétés, qui prennent un temps considérable et ne sont pas toujours couronnés de succès, loin s'en faut. Aussi, toutes les fois que la chose est possible, on préfère s'adresser à des méthodes d'*isolement,* basées sur telle ou telle propriété du microbe

que l'on se propose d'obtenir à l'état de pureté. On sait, par exemple, que les espèces *thermophiles* ne se développent qu'au-dessus de 40°. Pour les isoler, on chauffera lentement l'eau, en faisant des prélèvements à 50°, 55°, 60°, etc..., puis, suivant le conseil de M. Miquel, on ensemencera les prises sur des milieux à la gelée de lichen, maintenus aux températures correspondantes. Pour obtenir les espèces *frigoriphiles,* les milieux nutritifs, ensemencés, seront conservés au-dessous de 18°.

Si l'on désire rechercher les espèces *zymogènes*: ferments lactiques, butyriques, acétiques, ammoniacaux, sulfhydriques, nitriques, etc., il faut user de milieux appropriés (à base de sucres, d'urée, de soufre, etc.). Nous ne pouvons entrer dans le détail de tous ces cas.

Lorsqu'on veut savoir, d'une manière générale, si une eau renferme des *organismes pathogènes,* susceptibles de nuire à la santé des consommateurs, MM. Pouchet et Bonjean conseillent le procédé suivant. Ils ensemencent de petits ballons Pasteur, contenant 10 centimètres cubes de bouillon, avec 30 centimètres cubes de l'eau suspecte. Ils les laissent ensuite à l'étuve à 37°, pendant 8 jours. Le 8e jour, ils pratiquent, chez un cobaye, une injection intrapéritonéale de 0cc,3 à 0cc,5 de culture, pour 100 grammes du poids de l'animal et ils suivent, d'heure en heure pendant les 4 premiers jours et de jour en jour par la suite, les variations de poids et de température du cobaye. Les inoculations de cultures, provenant d'eaux très pures, influenceraient à peine la température et le poids ; au contraire, lorsque les eaux sont de mauvaise qualité, on observerait de grands écarts thermiques et des chutes de poids considérables. A l'autopsie, on ne négligera pas, bien entendu, de pratiquer des ensemencements. A côté de ce *procédé*

global et empirique, nous étudierons les *méthodes spéciales et exactes,* qui permettent d'isoler des eaux les divers vibrions, le colibacille et le bacille typhique.

Recherche des vibrions.

On verse, dans un ballon jaugé à 100 centimètres cubes, 10 centimètres cubes du mélange suivant :

Eau.	100	grammes.
Peptone.	10	—
Sel marin (*ad libitum*). .	10	—
Gélatine (*ad libitum*). . .	20	—

On ajoute l'eau à examiner jusqu'à la marque 100 et on porte à l'étuve à 37°. A partir de la 6e heure, on examine au microscope la surface du liquide, en ayant soin de ne pas agiter celui-ci. Si les vibrions sont abondants, on fait des isolements sur gélose. S'ils sont rares, on pratique un passage dans 4 à 5 tubes d'eau peptonisée à 1 pour 100, salée à 1 pour 100 et gélatinée à 2 pour 100. S'ils font défaut, on recommence l'épreuve (à cet effet, il est bon de conserver toujours à la glacière une certaine quantité de l'eau suspecte). Rappelons que, parmi les vibrions trouvés dans les eaux, beaucoup n'offrent aucune analogie avec le vibrion de Koch ; d'autres participent à un plus ou moins grand nombre de ses caractères ; certains n'en diffèrent nullement. Il faut toujours recourir au criterium de l'immunsérum (voir le chapitre Choléra) et, si possible, à l'épreuve de l'ingestion chez les jeunes lapins (avec microbes favorisants).

Recherche du colibacille et du bacille d'Eberth.

Parmi les nombreux moyens qui ont été préco-

nisés pour isoler ces deux micro-organismes (Chantemesse et Widal, Rodet, Vincent, etc.), nous ne retiendrons que les procédés de MM. Péré, Elsner et Remy.

Procédé de Péré.

Dans un ballon, jaugé à 100 centimètres cubes, on verse 20 centimètres cubes d'eau peptonisée à 3 pour 100 et 2 centimètres cubes d'eau phéniquée à 5 pour 100. On ajoute l'eau suspecte jusqu'à la marque 100 et on porte à l'étuve à 37°. Si le liquide se trouble, on ensemence un tube d'eau peptonisée (1 pour 100) et phéniquée (1 pour 1 000) et, 6 heures après, qu'il y ait trouble ou non, on fait un passage dans un second tube du même milieu. On attend que le liquide de ce second tube se trouble à son tour et on repique en bouillon ordinaire. Avec cette dernière culture, on fait des séparations en gélatine. Le colibacille donne généralement des colonies opaques et assez volumineuses, le bacille d'Eberth des colonies plus fines et translucides. On prélèvera les unes et les autres et on les étudiera, ainsi qu'il va être indiqué, à propos du procédé Elsner. La méthode de Péré, excellente pour l'isolement du bacille d'Escherich, ne donne pas autant de garanties quand il s'agit de rechercher le bacille typhique ; par contre, elle constitue le meilleur moyen de retrouver le *pneumobacille* dans les eaux.

Procédé d'Elsner.

Nous avons indiqué, dans la première partie de cet ouvrage, le mode de préparation du milieu que l'on devra employer. La méthode d'Elsner constitue un excellent moyen de recherche, à condition de faire porter l'analyse sur une grande quantité d'eau (il faut ensemencer, par échantillon, au moins 15 ou 20 boîtes de Petri) et d'étudier la presque totalité des colo-

nies, non liquéfiantes, qui se développent. D'après M. Elsner, le colibacille et le b. d'Eberth pousseraient, dans la gélatine formulée par lui, à l'exclusion des autres germes et ils le feraient avec des caractères très différents. Les colonies du b. typhique seraient petites, transparentes, à peine visibles; celles du b. coli plus grandes et un peu opaques. Les premières n'apparaîtraient que vers le 4e jour; les secondes, plus hâtives, naîtraient dès le 2e. Il est loin d'en être ainsi : des bactéries, autres que le b. coli et le b. typhique, des bactéries liquéfiantes en particulier, peuvent parfaitement se développer dans le milieu d'Elsner. D'autre part, alors que certaines colonies punctiformes et transparentes sont constituées par du colibacille, d'autres, plus volumineuses et un peu opaques, montrent tous les caractères du b. typhique. On conçoit que, dans ces conditions, l'isolement du b. d'Eberth demande beaucoup de temps et de patience. Celui du b. d'Escherich est par contre d'une très grande facilité.

On liquéfie, au bain-marie, 15 à 20 tubes de milieu d'Elsner. Lorsque le refroidissement est suffisant, on coule le milieu nutritif dans des boîtes de Petri. Celles-ci ont reçu, au préalable, un demi à un centimètre cube de l'eau à analyser (suivant sa richesse présumée en germes). On mèle intimement, on fait faire prise et on porte à 22°. Au bout de 48 heures, on commence à noter, soit à l'œil nu, soit au microscope, le développement des colonies, mais, à ce moment, les germes liquéfiants ne se distinguent pas encore des non liquéfiants. Il est donc trop tôt pour faire les repiquages. Dès que la distinction est possible, toutes les colonies non liquéfiantes (et non chromogènes) sont prélevées et ensemencées en bouillon. Les cultures qui montreront des bacilles mobiles et décolorés par la méthode de Gram seront

soumises aux diverses épreuves permettant la différenciation du b. coli et du b. typhique. *Pratiquement*, on peut se contenter d'ensemencements en milieu Fränkel. Les bacilles qui ne se développent pas dans ce milieu seront l'objet d'une étude spéciale, au point de vue de leur nature typhique ; ceux qui y poussent seront examinés au point de vue de leur identification avec le colibacille. Il est bon de savoir que la méthode d'Elsner permet de déceler certains organismes intermédiaires au b. d'Escherich et au b. d'Eberth. Dans un travail fait en collaboration avec le Dr Schneider, l'un de nous a attiré l'attention sur une espèce de ce genre (retrouvée, depuis, un grand nombre de fois) qui, sauf l'agglutinabilité par le sérum spécifique et le pouvoir pathogène, possède tous les caractères du b. d'Eberth le plus authentique.

Procédé de Remy.

M. Remy conseille de pratiquer, dans sa gélatine différentielle acide (0,5 pour 1 000 SO^4H^2) lactosée (3 pour 100) et phéniquée (0,25 pour 1 000), dont nous avons donné ailleurs le mode de préparation, deux sortes d'ensemencements, direct et indirect.

1° *Ensemencement direct.* — A un tube de gélatine, on ajoute 1/20, 1/10, 1/2 centimètre cube d'eau, suivant l'origine de celle-ci, et on coule : c'est la plaque n° 1. La plaque n° 2 s'obtient avec la même gélatine, contenant 0,5 pour 1 000 d'acide phénique. En outre, le tube qui renferme cette dernière reçoit 1/10, 2/10, 1 centimètre cube d'eau, suivant les cas. On peut faire plus de deux plaques, mais on se souviendra que les dilutions les plus fortes doivent toujours être pratiquées dans les tubes dont la gélatine contient les doses les plus faibles d'acide phénique.

2° *Ensemencement indirect.* — 10, 20, 50 centimètres cubes, suivant l'origine de l'eau à analyser,

sont introduits dans un matras, renfermant du bouillon acidifié par SO^4H^2 et phéniqué, de telle sorte que le mélange de bouillon et d'eau contienne 0,5 pour 1 000 des acides sulfurique et phénique. Après un séjour de 22-24 heures à la température de 30°, on fait des plaques, en gélatine différentielle (additionnée de 0,25 et 0,5 pour 1 000 d'acide phénique), avec des dilutions qui varient suivant le degré de trouble du mélange. Les tubes de gélatine les moins phéniqués reçoivent, comme toujours, les dilutions les plus fortes. Les plaques sont abandonnées à la température de 22°. Dès le 2e ou le 3e jour, on procède à l'examen des colonies. On marque au crayon celles qui, profondes, apparaissent bleutées ou d'un blanc bleuté. C'est parmi elles qu'on trouvera les bacilles typhiques authentiques, les bacilles d'Eberth non agglutinables, les colibacilles affaiblis et d'autres organismes de confusion. S'il n'existe que peu de ces colonies, elles seront repiquées en bouillon (préalablement chauffé à la température de 37°, afin d'obtenir rapidement la liquéfaction du fragment de gélatine transporté avec la colonie) ; après agitation, les tubes de bouillon seront placés à la température de 30°. S'il existe, au contraire, beaucoup de colonies, l'étude des modifications qu'elles subissent peu à peu permet d'en éliminer un certain nombre. Les colonies typhiques peuvent augmenter de volume, mais elles conservent leur aspect blanc bleuté. Parmi les colonies bleutées, les unes prennent rapidement une teinte brunâtre (colibacilles attaquant le lactose), les autres gardent leur aspect bleuté (colibacilles privés de leurs propriétés classiques). La distinction des colonies typhiques, non seulement d'avec les colonies côliennes, mais encore d'avec les colonies de diverses bactéries constituant la flore habituelle des eaux, est parfois difficile, sinon impossible, et, dans bien des cas, on

ne parvient à tourner la difficulté qu'en multipliant les repiquages. C'est exactement ce que nous avons dit au sujet du milieu d'Elsner. — M. Remy attire l'attention sur ce fait que les bacilles typhiques des eaux donnent parfois un voile marqué en bouillon.

B. *Analyse chimique.*

Si l'on se borne à pratiquer (même avec le plus de soin possible) l'analyse quantitative et qualitative d'un échantillon d'eau, on ne possède pas tous les éléments nécessaires pour porter sur cette eau un jugement valable. Il est, en particulier, diverses questions que le bactériologue doit poser au chimiste et la réponse de celui-ci lui sera d'un très grand secours pour formuler une appréciation définitive. Ces questions sont les suivantes :

1° Quelle est la *quantité d'oxygène dissous* dans l'eau ? Les microbes (aérobies) absorbant l'oxygène, plus il y aura de germes dans une eau, plus ce gaz en disparaîtra rapidement. Voici deux exemples, qui fixeront les idées. La Seine, à Choisy, renferme 10^{mg},3 d'oxygène dissous par litre ; elle n'en contient plus que 9,2 à Ivry, 8,6 à Chaillot et 7,7 à Saint-Denis. Un litre d'eau de Seine, renfermant 10^{mg},6 d'O dissous par litre, est conservé à la température du laboratoire ; 8 jours plus tard, il n'en montre plus que 7,2 ; 16 jours après, il n'en contient plus du tout. Les eaux pures, qui recèlent des algues vertes, susceptibles de dégager de l'oxygène au contact de la lumière, offrent, au contraire, une quantité croissante d'O, au fur et à mesure que ces organismes se développent. C'est ainsi qu'un litre d'eau de la Vanne, renfermant 1^{mg},1 d'O dissous par litre et conservé à la température ordinaire, contenait,

8 jours plus tard, $20^{mg},2$ d'O ; il en montrait 37,7 15 jours après.

2° Une seconde question vise la *quantité « de matière organique »*. Sous la dénomination générale de matière organique, on réunit, un peu arbitrairement, les divers composés d'origine végétale ou animale contenus dans l'eau. Ces composés sont susceptibles d'être détruits plus ou moins facilement par oxydation. Leur évaluation repose sur ce fait que, si on additionne de permanganate de potasse une eau renfermant de la matière organique, on voit la coloration caractéristique disparaître peu à peu. Certaines substances enlèvent plus d'oxygène au permanganate en solution acide qu'en solution alcaline, tandis que d'autres se comportent inversement. Lorsque le chiffre d'oxygène, absorbé par la matière organique contenue dans un litre d'eau, dépasse 1 milligramme et que ce chiffre se montre plus élevé en solution alcaline qu'en solution acide, on doit tenir l'eau pour très suspecte.

3° Une troisième question a trait à la *quantité d'Az. ammoniacal et d'Az. nitrique*. La matière organique se transforme successivement, comme on le sait, en AzH^3 et en AzO^3H. L'Az. ammoniacal est l'indice de putréfactions récentes ou voisines, qu'un hasard peut rendre actuelles ou présentes. L'eau qui ne contient plus que de l'azote nitrique représente une eau dans laquelle le cycle de l'épuration spontanée est terminé. L'abondance de l'azote nitrique constitue cependant un élément défavorable, car elle témoigne de l'abondance de la matière organique élaborée et, par là même, de l'imminence d'une nouvelle contamination. De petites quantités de nitrates représentent, au contraire, un bon indice de purification. Notons en terminant que le *taux élevé des chlorures* doit être tenu pour un signe certain de pollution (Duclaux).

C. *Appréciation des résultats fournis par l'analyse bactériologique et l'analyse chimique.*

L'analyse étant terminée, il importe de formuler un jugement définitif et c'est là, certes, la partie la plus délicate de l'expertise. Il n'existe, en effet, *aucun criterium absolu* de la bonne qualité d'une eau et c'est sur un *ensemble de notions* (dont beaucoup sont encore discutées) qu'on est obligé d'asseoir son opinion.

Il semble tout d'abord qu'il faille tenir grand compte de la *quantité des germes* et chacun connaît le tableau suivant, de M. Miquel, indiquant la pureté des eaux en fonction du nombre de microbes qu'elles renferment par centimètre cube :

Eau exccessivement pure. . .	de	0	à	10	germes.
— très pure..	de	10	à	100	—
— pure..	de	100	à	1 000	—
— médiocre.	de	1 000	à	10 000	—
— impure.	de	10 000	à	100 000	—
— très impure.	de	100 000	et plus.		

Mais nous avons déjà insisté sur les imperfections et les lacunes de l'analyse quantitative. D'autre part, il est à peu près indifférent d'absorber un grand nombre de saprophytes, tandis que l'ingestion d'une bien moindre quantité de pathogènes peut avoir les pires effets.

M. Migula a avancé qu'il fallait attacher une grande importance au *nombre des espèces* microbiennes. C'est ainsi que, pour lui, une eau doit être rejetée, lorsqu'elle contient plus de 10 espèces différentes. Ces allégations restent très discutables.

La *date de la liquéfaction de la gélatine*, indiquée par M. Proust comme criterium de la qualité d'une

eau, ne rendra pas non plus grand service. En effet, nombre d'espèces liquéfiantes ne sont pas pathogènes et beaucoup d'espèces pathogènes ne digèrent pas la gélatine. On sait que l'eau du Rhône, à Lyon, est beaucoup plus pure que celle de la Saône ; elle renferme cependant infiniment plus de colonies liquéfiantes. Il est bon toutefois de sentir l'odeur que dégage la gélatine liquéfiée ; une odeur fétide ou ammoniacale trahira la présence d'espèces putrides et constituera un indice défavorable.

Une importance majeure sera accordée à *l'existence des germes pathogènes* et c'est certainement la présence ou l'absence de ceux-ci qui *dictera surtout l'appréciation définitive*. Cependant, là encore, nous devons faire quelques réserves (on aura soin, bien entendu, de ne pas en exagérer la portée). Le b. pyocyanique se rencontre en Tunisie dans des eaux de la meilleure qualité et n'a jamais déterminé d'accidents. On ne conçoit pas trop quels désordres pourrait entraîner l'ingestion du bacille de Friedländer, du staphylocoque, et même du streptocoque, organismes qu'il n'est pas rare de rencontrer dans les eaux. Le b. coli est ubiquitaire, il a été isolé des sources les plus pures ; aussi sa présence ne saurait-elle trahir constamment une contamination fécale. Il n'est pas jusqu'aux vibrions et même au bacille de la fièvre typhoïde qui ne puissent, semble-t-il, être parfois ingérés impunément. L'un de nous a rencontré le bacille d'Eberth dans l'eau, en dehors de toute épidémie de fièvre typhoïde et chacun sait que des vibrions, réellement identiques à celui de Koch, ont été isolés dans les circonstances les plus variées et notamment en pleine canalisation d'une des villes qui jouissent de l'immunité contre le choléra.

Il serait pareillement inexact de se baser uniquement sur la *teneur en matière organique*. Les aquas

nigras des hauts plateaux des Andes, colorées en brun foncé par des substances organiques, empruntées à un sol granitique et les eaux jaunâtres d'Arcachon, teintées par l'humus du sous-sol, se montrent très riches en matière organique et ne sont cependant pas de mauvaise qualité. Inversement, une eau renferme parfois du b. coli ou du b. d'Eberth et n'offre à l'analyse que très peu de matière organique.

D. *Manière de faire une enquête sur une eau de boisson.*

Les quelques considérations précédentes feront aisément comprendre à quelles difficultés se heurte le bactériologue qui, du fond de son laboratoire, veut apprécier la valeur d'une eau de boisson. Aussi bien n'est-ce pas uniquement d'après les résultats des analyses bactériologique et chimique qu'il convient de se prononcer, mais encore d'après les données de l'*enquête hygiénique* qui, chaque fois, doit précéder l'analyse. Ainsi que le demande M. Duclaux, cette enquête devra, *autant que possible,* être *menée par le bactériologue lui-même.* Sur quels points doit-elle porter ?

Elle visera, avant tout, les *conditions géologiques locales* (perméabilité du sol traversé et causes d'infiltration). Les grès constituent des filtres parfaits. Ils fournissent des eaux excellentes, même sous de faibles épaisseurs. Les alluvions, modernes ou anciennes, ne donnent de l'eau potable que si le gravier est d'un grain assez fin et la couche suffisamment épaisse. M. Martel a attiré l'attention sur le danger permanent de pollution auxquels se trouvent exposées la plupart des sources provenant des terrains calcaires, par suite de la filtration incomplète qui se produit dans les fissures et aussi par suite de la déplorable

habitude qui consiste à précipiter les cadavres des animaux dans les fentes les plus larges et à laisser pénétrer des ordures dans les plus étroites. M. Duclaux a montré de son côté qu'un danger semblable est à redouter pour tous les terrains perméables et poreux, avec cette différence cependant que la nitrification intervient parfois et détruit la matière organique apportée par l'eau avant que cette matière (avec les germes qui l'accompagnent) ait pu atteindre la nappe souterraine. Indiquons brièvement les services que les matières colorantes sont appelées à rendre pour la recherche des eaux d'infiltration. On donnera la préférence à la *fluorescéine* (Trillat); la quantité nécessaire variera de 100 à 1 000 grammes. Elle sera dissoute dans de l'alcool, additionné d'environ 5 pour 100 d'AzH^3. On aura toujours soin de se munir du *fluoroscope* de Trillat, qui permet de déceler la fluorescéine en solution extrêmement étendue. Récemment, M. Miquel a conseillé l'emploi de la *levure de bière,* qui constitue aussi un excellent indicateur. Elle n'existe pas, en effet, dans les eaux et pourra y être facilement décelée, par l'épreuve de la fermentation, lorsqu'elle y aura pénétré.

Les conditions géologiques locales ayant été étudiées, le bactériologue devra faire porter son enquête sur les *procédés de captation,* et sur l'*état des canalisations.* Il visitera les réservoirs publics (s'informant de la date et des conditions de leur nettoyage) et les réservoirs privés (on connaît la fréquence des épidémies de maison). L'*étanchéité des puits* sera, le cas échéant, l'objet d'un examen minutieux ; on se rappellera que, seuls, les puits métalliques sont à l'abri de la critique. L'enquête s'étendra enfin sur les *circonstances météorologiques* capables, elles aussi, de fausser les résultats de l'analyse. Y a-t-il eu des chutes de pluie ou de fontes de neige, les jours qui

ont précédé le prélèvement de l'échantillon ; l'eau est-elle devenue trouble, etc... Rappelons, pour terminer, qu'*une seule analyse ne suffit pas*, bien entendu, pour permettre de formuler une appréciation définitive. Il sera toujours nécessaire de multiplier les expertises et de les pratiquer dans des conditions différentes, aux diverses périodes de l'année notamment.

E. *Purification des eaux.*

On purifie les eaux dans *deux buts différents*, soit pour les rendre le moins dangereuses possible (épuration des eaux d'égout), soit pour les rendre propres à la consommation. Le bactériologue sera souvent consulté à ce sujet ; aussi croyons-nous devoir en faire mention, dans ses points essentiels.

Épuration des eaux d'égout.

L'*épuration* des eaux d'égout *peut s'opérer de quatre façons* : par les fleuves, par le sol, par les procédés chimiques et par les procédés biologiques.

Épuration par les fleuves.

C'est le « tout à l'égout » et « tout l'égout au fleuve ». Il est donc indispensable que le volume du fleuve soit proportionné à celui de l'égout. Cette méthode escompte l'épuration « spontanée » des fleuves, dont nous devons dire ici quelques mots. Les fleuves s'épurent, spontanément, à la fois au point de vue chimique et au point de vue microbien. C'est ainsi que la presque totalité de la matière organique de la Seine disparaît entre Paris et Meulan. D'autre part, l'Isar arrive à Munich avec 305 germes ; il en

sort avec 12 600 ; à 33 kilomètres il n'en renferme plus que 2 400 ; il a perdu, en 8 heures, les 5/6 de ses micro-organismes (Prausnitz). L'épuration reconnaît pour cause des facteurs mécaniques, physiques et biologiques. Le *mouvement* de l'eau paraît tout d'abord avoir une certaine importance ; il agit en effet en renouvelant la surface de contact avec les rives et favorise ainsi l'adhérence capillaire entre celles-ci et une grande quantité de liquide. Il a été démontré cependant que les fleuves à cours lent s'épurent parfois aussi bien, sinon mieux, que les fleuves à cours rapide. C'est que la *sédimentation* joue incontestablement un rôle capital. Les lacs, interposés sur le trajet des cours d'eau, comme le lac de Havel sur le trajet de la Sprée, forment en effet de véritables bassins de décantation. L'influence de la *lumière* sur la disparition des germes est prouvée par un grand nombre d'expériences. MM. Frankland et Ward ont montré que les spores charbonneuses mouraient plus vite, dans l'eau, à la lumière qu'à l'obscurité. M. Buchner, ensemençant abondamment de l'eau de l'Isar avec des espèces microbiennes (non sporulées), les a vues périr en 3 jours à la lumière diffuse et en 1 heure au soleil. Du reste, l'Isar renferme plus de germes à la fin de la nuit qu'à la fin du jour. Il faut enfin mentionner, parmi les causes les plus puissantes d'épuration, la *concurrence vitale* qui s'exerce entre les microbes et surtout la *disparition* progressive *de la matière organique*. Il va de soi qu'à mesure que l'azote albuminoïde se transforme en azote ammoniacal, puis en azote nitrique, le nombre des espèces doit diminuer parallèlement.

Épuration par le sol.

Dans un terrain argileux, bien drainé, l'épuration

peut être poussée très loin. A Gennevilliers, l'eau arrive avec 13 800 000 germes par centimètre cube ; elle sort avec 410 germes (drain d'Asnières), 6 745 (drain d'Argenteuil), 7 945 (drain de la Garenne), 14 795 (drain d'Épinay) et se déverse alors dans la Seine, qui contient à ce moment plus de 200 000 germes. Pour que l'*épandage* donne de bons résultats, il est indispensable que la filtration demeure intermittente. Certaines villes préfèrent l'*utilisation agricole* à l'épandage ; il semble bien qu'elles aient raison. Quant à celles qui veulent combiner l'épandage et l'utilisation agricole, on ne peut que les blâmer.

Épuration par les procédés chimiques.

En voici un exemple bien connu. Les eaux d'égout de Londres sont reçues, à Barthing, dans de grands bassins de décantation ; elles passent ensuite dans une usine, où on les additionne d'eau de chaux et de sulfate de fer, puis de permanganate de potasse, avant de les laisser s'écouler dans la Tamise. Malgré tout, le fleuve se trouve encore profondément souillé.

Épuration par les procédés biologiques.

On fait d'abord arriver les eaux dans une « fosse septique », où la fermentation anaérobie solubilise la plus grande partie des matières organiques. Puis, on les conduit sur des « filtres aérobies », constitués par du coke, de l'argile cuite, ou mieux du machefer et fonctionnant d'une façon intermittente. Nous renvoyons à une revue récente de M. Calmette, pour la description des appareils usités en Angleterre et qui semblent donner d'excellents résultats. Peut-être, dans certains cas, y aurait-il avantage à associer les procédés chimiques et les procédés biologiques.

Purification des eaux destinées à la consommation.

Elle comprend la purification *en grand* et la purification *pour les usages domestiques.*

Purification en grand.

1) Nombre de villes utilisent les *filtres de sable.* Le sable agit en modérant la vitesse de l'eau et en servant de soutien à *une couche glaireuse* (due à un riche développement microbien), qui *constitue le véritable filtre.* Il y a donc à considérer non seulement l'arrêt mécanique des germes, mais encore et surtout d'importants phénomènes d'épuration biologique. On composera les filtres de la façon suivante. Au fond, on placera de gros cailloux lavés ; au-dessus d'eux, du gravier, puis du sable de plus en plus fin. On humectera le filtre et on chassera l'air en faisant arriver l'eau par en bas. L'air une fois expulsé, on renversera le courant. Il est bon de décanter l'eau avant de la filtrer ; il est indiqué d'autre part de couvrir les filtres. Une fois l'opération en train, on augmente peu à peu la pression, à mesure que la couche glaireuse s'épaissit, mais il ne faut pas aller au delà d'une certaine limite, sous peine de voir passer les germes en abondance. *On arrête* donc l'*écoulement* de l'eau *lorsque la pression* à employer *deviendrait trop forte*; on laisse le filtre s'épuiser, on le nettoie et on recommence. L'intervalle, compris entre deux nettoyages, constitue ce qu'on appelle une *période.* D'après M. Koch, il ne faut jamais dépasser une vitesse d'écoulement de 100 millimètres à l'heure ; il faut également pratiquer chaque jour l'analyse bactériologique et ne pas distribuer d'eau contenant plus de 100 colonies par centimètre cube.

2) Certaines villes, que traverse un fleuve, ont recours aux *galeries filtrantes* pour se procurer de l'eau potable. Ces galeries sont creusées parallèlement au fleuve, à un niveau plus bas que lui et à une distance qui varie suivant le degré de perméabilité du terrain. Un *inconvénient très sérieux* est le suivant. Si les galeries reçoivent les eaux qui viennent de la rivière, elles sont également susceptibles de recevoir les eaux qui s'y rendent, notamment celles qui proviennent de la nappe des puits. De ce côté, en effet, l'encrassement est moins facile que du côté du fleuve, car les alternatives de noyage et d'aération opèrent un nettoyage véritable; d'autre part, la quantité d'eau se trouve bien moins considérable par rapport à la surface perméable. Il convient donc de *surveiller avec soin les eaux ainsi obtenues*.

3) Un certain nombre de *procédés chimiques* ont été mis en usage pour purifier les eaux de boisson. Nous ne mentionnerons que les deux principaux. Dans le *système Anderson*, on fait passer l'eau sur des copeaux ou des rognures de fer, en agitant pour que l'oxygène intervienne. Des sels terreux se forment. On laisse ensuite circuler l'eau au contact de l'air; ces sels s'oxydent et il se produit un précipité gélatineux d'hydrate ferreux, qui entraîne mécaniquement les micro-organismes. On décante et on filtre. Il ne reste alors que fort peu de germes. Dans le *système Clarke*, on ajoute de la chaux, en quantité suffisante pour produire du carbonate de chaux aux dépens du bicarbonate que contient l'eau. Le carbonate « colle » le liquide et le précipité formé entraîne les germes. De plus, l'alcalinité du milieu gêne le développement de ceux-ci pendant l'opération. On arrive à réduire ainsi les bactéries au taux de 1 pour 100. MM. Gaillet et Huet conseillent, pour perfectionner la méthode Clarke, l'addition d'un peu de soude, qui libère la chaux que l'eau contient

à l'état de sulfate et de chlorure de calcium. Il va de soi que les divers procédés chimiques exigent un *dosage rigoureux des substances employées.*

4) L'*ozonisation* semble bien représenter le *meilleur moyen de purification* des eaux. MM. van Ermengem, Marmier et Abraham ont fait, à cet égard, des essais très démonstratifs, l'un sur l'eau du Vieux Rhin, les autres sur l'eau destinée à la consommation de la ville de Lille. L'eau du Vieux Rhin, que nous prendrons comme exemple, est jaunâtre, possède une mauvaise odeur et un goût désagréable et renferme, par centimètre cube, jusqu'à 100 000 germes. Cette eau, filtrée sur sable, avec une vitesse de 100 millimètres à l'heure, demeure encore jaune, désagréable au goût et à l'odorat et riche en microbes. Si on la traite, à ce moment, par une quantité suffisante d'ozone, toutes les bactéries disparaissent, à l'exception des espèces sporulées ; la matière organique devient beaucoup moins abondante ; l'eau est claire, agréable à boire et ne conserve, en aucune façon, le goût d'ozone. Pour que ce mode de stérilisation donne de bons résultats, il faut toutefois que l'eau ne contienne pas trop de matière organique et que l'air ozonisé, qui joue ici le rôle d'agent bactéricide, soit privé de vapeur d'eau, d'acide carbonique et de poussières.

(5) Mentionnons enfin la *stérilisation à* 115°, telle qu'elle est pratiquée à l'aide des appareils Rouart et Geneste-Herscher ou Vaillard et Desmaroux. Ce dernier, d'un fonctionnement très simple et d'un prix de revient relativement peu élevé, fournit une eau agréable à boire et absolument indemne de germes. Dans les garnisons, décimées par, la fièvre typhoïde ou la dysenterie, son usage a été suivi de la disparition rapide de ces affections. La stérilisation à 115° ne saurait s'appliquer, bien entendu, à une ville entière,

tout au moins en dehors de graves épidémies (choléra).

Purification pour les usages domestiques.

Le moyen le plus simple à employer est l'*ébullition*; elle détruit environ 995 germes sur 1 000, mais l'eau qui a bouilli a besoin d'être ensuite aérée et, au contact de l'air, elle récupère rapidement un certain nombre de microbes, peu dangereux il est vrai (Miquel). Nous avons décrit ailleurs le *filtre Chamberland*. Nous n'y reviendrons pas. Indiquons simplement deux *procédés chimiques*, qui pourront rendre parfois des services. Dans le *procédé Bassenge*, on ajoute, à 5 litres d'eau, une pincée de chlorure de chaux en poudre, puis on additionne, goutte à goutte, le liquide de bisulfite de chaux, jusqu'à disparition de Cl., constatée par le goût et l'odorat. Le *procédé Bordas et Girard* réside dans l'emploi du permanganate de potasse (ou mieux du permanganate de chaux), à la dose d'un gramme pour 10 litres d'eau ; on le réduit, ultérieurement, à l'aide de diverses substances organiques (charbon, alcool, sucre, infusion de thé, etc.).

F. *Eaux minérales, eaux gazeuses, glaces, boissons.*

Eaux minérales.

Cette remarque de M. Miquel, que, dans les eaux soustraites à leurs conditions normales, le nombre des germes augmente rapidement et dans de très fortes proportions, donnait à supposer, *a priori*, que les eaux minérales peuvent renfermer un chiffre, parfois élevé, de microbes. De fait, sur 22 échantillons, MM. Moissan et Grimbert ont rencontré, par centimètre cube :

De 100 à 1 000 germes	. . . . .	1 fois.
De 1 000 à 10 000 —	. . . . .	8 —
De 10 000 à 100 000 —	. . . . .	10 —
Plus de 100 000 —	. . . . .	3 —

Un échantillon d'eau de Saint-Galmier (source Badoit), contenant 159 000 germes par centimètre cube ; un échantillon d'eau de Couzan (source Brault) 183 000 ; un échantillon d'eau d'Alet (Buvette), 107 500. Le bactérium coli et le proteus ont été fréquemment isolés des eaux minérales. Afin de parer, dans la mesure du possible, à une telle infection, il est indiqué de protéger les griffons contre les contaminations extérieures, de faire des analyses périodiques pour dépister les infiltrations superficielles et, enfin, de stériliser les bouteilles à l'acide sulfurique étendu, de les rincer à l'eau stérilisée et de pratiquer l'embouteillage dans des locaux maintenus à l'abri des poussières. A Vichy, où il est veillé, avec grand soin, à l'exécution de ces mesures, les résultats obtenus se sont montrés très satisfaisants.

Eaux gazeuses.

Dans les eaux gazeuses, les germes diminuent d'autant plus vite que l'acide carbonique se trouve à une pression plus forte (Leone). Toutefois, il ne faut guère compter pratiquement sur l'action antiseptique de CO^2. En voici la preuve. Dans 4 examens d'eau de Seltz, MM. Moissan et Grimbert ont trouvé, par centimètre cube :

De 100 à 1 000 germes	. . . . .	1 fois.
De 1 000 à 2 000 —	. . . . .	3 —

Dans 4 examens d'eaux gazéifiées, ils ont trouvé :

De 100 à 1 000 germes	. . . . .	1 fois.
De 1 000 à 2 000 —	. . . . .	3 —

Glaces.

La congélation est absolument insuffisante, comme on le sait, pour amener la mort des microbes. Aussi la glace se montre-t-elle aussi mauvaise que l'eau dont elle provient et certains cas de fièvre typhoïde ont-ils pu lui être attribués. Lorsqu'elle est produite artificiellement, le chiffre des germes qu'elle contient augmente encore, car l'eau qui sert à la fabriquer se souille toujours plus ou moins, au contact des moules métalliques dans lesquels on réalise la congélation. Les glaces préparées avec de l'eau stérilisée ne renferment, au contraire, qu'un très petit nombre d'organismes, de 20 à 80 par centimètre cube, ainsi qu'il résulte des analyses de l'un de nous. Il est donc à désirer que leur usage se généralise.

Boissons.

Vin. — Ainsi que Pasteur l'a établi le premier, les vins *naturels* renferment de nombreuses cellules de levure, mais une très petite quantité seulement de bactéries. Dans les vins *artificiels,* c'est la proportion inverse que l'on observe. La présence d'un grand nombre de bactéries indiquera donc l'addition d'eau malpropre.

Dans des analyses de vins de raisin sec, l'un de nous a rencontré plusieurs fois le b. coli. Dans un fort, alimenté par une eau excellente, une épidémie de fièvre typhoïde a pu, avec quelque vraisemblance, être attribuée au vin consommé, lequel contenait de nombreuses bactéries et notamment des colibacilles.

Cidre. — Les cidres sont ordinairement très riches en microbes. Le fait s'explique facilement. D'une part, ils sont fréquemment mouillés avec des eaux

malpropres. D'autre part, c'est une coutume très répandue dans les campagnes que d'employer pour la fabrication du cidre des eaux de mare, d'étang, etc., qui favoriseraient, soi-disant, la fermentation. Les analyses quantitatives donnent toujours des chiffres élevés (de 30 000 à 125 000 germes par centimètre cube, d'après l'un de nous). De plus, on rencontre fréquemment le b. coli, le proteus et des espèces putrides. Toutefois, le b. d'Eberth n'a jamais été isolé ; les expériences de M. Bodin ont même démontré, qu'introduit dans le cidre avec l'eau de mouillage, il était détruit au bout de 18 heures au maximum, lorsque l'acidité du liquide (exprimée en acide malique) atteint 2 pour 1 000 au moins. Or cette acidité se rencontre toujours dans la pratique.

CHAPITRE II

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DE L'AIR

Il suffit de jeter un coup d'œil sur un rayon lumi-
;eux, traversant une chambre obscure, pour juger
u grand nombre de corpuscules qui se trouvent en
ıspension dans l'air. *Autrefois,* on les étudiait sim-
lement à l'aide de l'*examen histologique.* Des pla-
ues, enduites de glycérine ou d'autres liquides siru-
eux, étaient abandonnés à l'air et on examinait, au
ıicroscope, les poussières qui se déposaient à leur
ırface. Les *aéroscopes* de Pouchet, de Miquel, de
addox, de Cunningham (aéroscope à girouette),
ıt réalisé un premier progrès. Mais, déjà, Pasteur
ait eu l'idée de recueillir les poussières sur du
oton-poudre, qu'il dissolvait ensuite dans un mé-
nge d'alcool et d'éther. Ces différentes méthodes
ıt permis d'assigner, aux poussières de l'air, une
iple origine. Elles sont constituées, en effet, par
ıe partie *inorganique* (débris siliceux, fer météo-
que., etc.), par une partie *organique* (débris ani-
aux et végétaux, tels que : fibres textiles, grains d'ami-
n, grains de pollen, corps d'insectes..., etc.), et par
ıe partie *organisée* (moisissures, bactéries). Cette
rnière, seule, nous intéresse. Son étude histolo-
que se trouve aujourd'hui complètement délaissée,
ur l'*analyse bactériologique,* que nous étudierons
clusivement.

I. *Numération des germes de l'air. — Sapro- phytes et pathogènes de l'air.*

Numération à l'aide des milieux liquides.

a) *Procédé de Pasteur.* — Pasteur se servait d *ballons à col effilé*, remplis au tiers de bouillon c veau. Il chauffait d'abord ces ballons, puis, le bouil lon étant en pleine ébullition, il fermait le col à lampe ; de cette façon l'air intérieur se trouvait ra réfié. On transportait les ballons à l'endroit où l'o désirait faire l'analyse de l'air. On brisait alors, ave de longues pinces stérilisées, l'effilure préalablemen flambée et l'air se précipitait à l'intérieur du vase. L col était scellé et le bouillon mis à l'étuve, de retou au laboratoire. Du nombre de fioles qui se trou blaient, on déduisait (leur capacité ayant été pré lablement déterminée) le nombre de germes, con tenus dans un mètre cube d'air.

b) *Méthode primitive de Miquel.* — Au début ses recherches, M. Miquel employait ses *tubes à boule,* bien connus, qu'il remplissait au tiers bouillon. Il faisait passer, à l'aide d'une trompe d'un aspirateur 1 à 3 litres d'air par tube. Puis, l'ef lure était fermée à la lampe, on repoussait la bour d'ouate, on scellait et on plaçait à l'étuve, à 37 L'analyse pouvait être considérée comme réussi lorsqu'il n'y avait pas plus d'1/5 des tubes qui s'alt raient. Cela donnait en effet à penser que l'altérati de chaque tube n'était due qu'à un seul germe (on pr tiquait d'ailleurs un examen histologique de contrôle

Numération à l'aide des milieux solides.

Méthodes primitives de Koch et de Hesse.

M. Koch se contentait d'exposer à l'air des plaqu

de gélatine et étudiait ensuite les colonies qui se développaient. Cette méthode, qui peut fournir quelques notions au point de vue qualitatif, ne donne, naturellement, aucun renseignement au point de vue quantitatif. M. Hesse se servait d'un tube de verre, de 50 centimètres de long et de 5 centimètres de diamètre, à l'intérieur duquel il coulait de la gélatine. Lorsque celle-ci avait fait prise, le tube était relié à un aspirateur et on le faisait traverser par une quantité connue d'air (fig. 200). En passant sur le milieu nutritif, l'air lui abandonnait ses poussières, avec leurs micro-organismes. L'opération terminée, le tube était porté à l'étuve à 22° et on comptait ultérieurement les colonies développées.

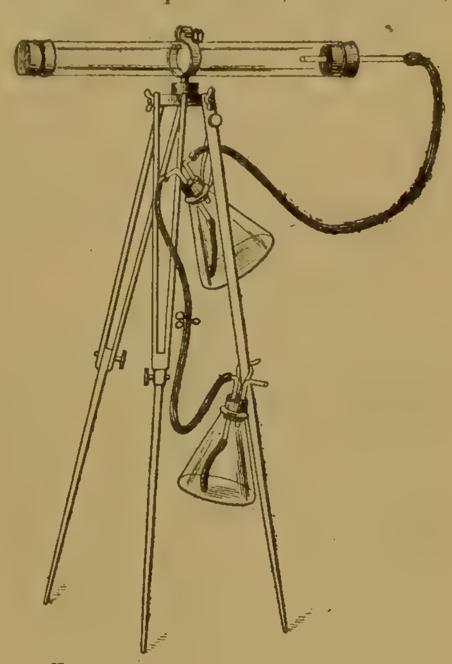


Fig. 200. — Appareil de Hesse.

Méthodes basées sur l'emploi des bourres (insolubles et solubles).

a) **Bourres insolubles.** — M. Petri emploie un tube de verre, dans lequel des rondelles de toile métallique délimitent deux loges, qu'on remplit de sable fin (fig. 201). L'appareil peut être mis en rapport avec un aspirateur. Le tube, garni, ayant été stérilisé, on le fait traverser par une quantité connue d'air.

On dissémine ensuite le sable dans de la gélatine, qui est coulée en boîtes. — M. Frankland se sert d'un tube analogue, mais il remplace le sable par de l'amiante;



Fig. 201. — Appareil de Petri.

l'aspiration terminée, les tampons d'amiante sont dissociés dans de l'eau stérile, qui sert à faire des plaques de gélatine.

b) **Bourres solubles.** — Les méthodes précédentes demeurent peu précises, car un grand nombre des organismes, contenus dans le sable ou l'amiante, peuvent se dérober à la culture. D'autre part, les colonies qui se développent autour des particules ensemencées, sont loin de naître toujours d'un seul germe. Aux bourres insolubles, on préfère aujourd'hui les *bourres solubles*, dont l'idée première revient à Pasteur (*ubi supra*), mais qui ont été systématiquement appliquées à l'analyse bactériologique de l'air par M. Miquel. On peut utiliser, comme bourre, le chlorure de sodium ou le sulfate de soude. Ces sels, préalablement chauffés pendant quelques heures à 200° pour les dessécher, sont ensuite pilés grossièrement au mortier, tamisés et introduits, dans une pipette de 5 à 10 centimètres cubes, sous le poids de



Fig. 202. — Bourre soluble.

1 ou de 2 grammes (fig. 202). L'appareil étant stérilisé, on fait passer, à travers la pipette (à l'aide de la pompe de Petri ou de la trompe à vapeur de

Wiessnegg), un certain nombre de litres d'air, 10 litres le plus ordinairement. On dissout la bourre soluble dans 10 centimètres cubes d'eau stérile et on fait des plaques de gélatine ou de gélose. C'est la seule méthode convenable, lorsqu'on ne peut pratiquer l'analyse que *loin* du point où les germes ont été recueillis, ou *longtemps après* le prélèvement. Notons que certains auteurs emploient le sucre comme bourre soluble. Notons aussi que, lorsqu'on fait usage du chlorure de sodium, il faut éviter de saler les milieux qui servent à faire les plaques.

Méthodes basées sur l'emploi du barbotage.

Lorsqu'on peut pratiquer l'analyse à une *distance peu éloignée,* ou *peu de temps après* le prélèvement, les meilleurs procédés sont, au contraire, ceux qui reposent sur le principe du barbotage.

a) M. *Miquel* se sert d'un *ballon à fond plat*, porteur d'une tubulure centrale, qui descend presque jusqu'au fond du vase (cette tubulure est fermée par un capuchon de verre, muni d'ouate) et de deux tubes latéraux, situés vers la partie supérieure (fig. 203). L'un de ces tubes, garni d'un tampon d'ouate, peut être mis en contact avec un aspirateur. L'autre, effilé, est fermé pendant l'opération et servira à la répartition du liquide (on peut interposer un bout de caoutchouc et une pince à pression sur son trajet). On verse, dans le bal-

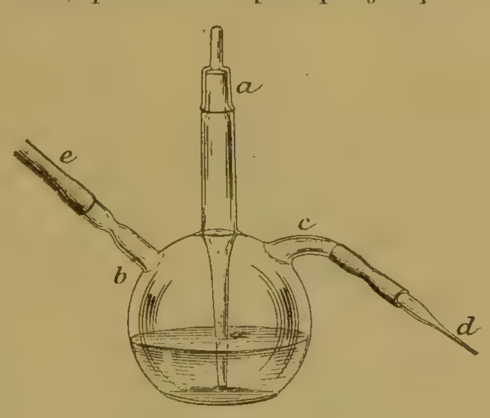


Fig. 203. — Ballon de Miquel.

lon, une quantité connue d'eau et on stérilise à l'autoclave. Puis, l'appareil est relié à l'aspirateur et on enlève le capuchon de verre : l'air vient alors barboter dans l'eau, après avoir pénétré par la tubulure centrale. Quand on a fait passer 10 litres, par exemple, on arrête l'opération et on recueille alors les germes qui se sont déposés le long de la tubulure centrale : pour cela, il suffit de rincer celle-ci plusieurs fois, en faisant monter et descendre, par aspiration, l'eau du ballon. On brise ensuite l'extrémité de la tubulure effilée et on répartit un volume donné du liquide dans une certaine quantité de gélatine, qui sert à faire des plaques.

b) L'*appareil de Straus et Wurtz* est très analogue au précédent (fig. 204). Il se compose d'un flacon

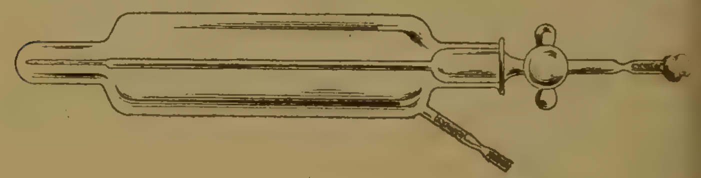


Fig. 204. — Appareil de Straus et Wurtz.

de verre cylindrique, dont l'orifice supérieur est obturé par un tube-pipette, muni d'une bourre d'ouate. Ce tube traverse le flacon et se termine, en bas, au fond d'un petit appendice. En haut, l'appareil porte une tubulure latérale, que l'on garnit d'un tampon de coton ; cette tubulure peut être mise en rapport avec un aspirateur. On verse, dans le cylindre, 10 centimètres cubes de gélatine liquéfiée, qui viennent remplir l'appendice. L'appareil est ensuite porté à l'autoclave. La gélatine étant convenablement refroidie, on verse, par-dessus, une goutte d'huile stérilisée, destinée à empêcher le liquide de mousser, au cours du barbotage ; puis, on pratique l'aspiration. L'air pénètre par le tube-pipette, dont on a préalablement

enlevé le coton et vient barboter dans la gélatine. Quand on a fait passer 10 litres environ, on arrête l'opération. On rince plusieurs fois le tube-pipette, en aspirant et refoulant la gélatine, puis, avec ce tube-pipette, on distribue le contenu de l'appendice dans des boîtes de Petri. Le reste du milieu est réparti sur les parois du cylindre, comme dans le cas d'un tube d'Esmarch. Notons que, pendant le barbotage, il faut tenir l'appendice dans la main, pour empêcher la gélatine de faire prise.

c) L'*appareil de choix est celui de M. Laveran* (fig. 205). Il se compose de deux tubes à essai de grande dimension, verticaux et reliés, au niveau de leur tiers supérieur, par une branche horizontale. Un seul est gradué en centimètres cubes ; tous deux sont fermés par un bouchon de caoutchouc. Celui-ci donne passage à une pipette effilée, qui plonge jusqu'au voisinage du fond de chaque tube. L'orifice supérieur des deux pipettes est obturé à l'aide d'un tampon de coton. Enfin, la pipette, correspondant au tube non gradué, est divisée en dixièmes de centimètre cube. On verse 10 centimètres cubes d'eau dans le tube jaugé et on stérilise à l'autoclave. Lorsqu'on veut se servir de l'appareil, on le met en rapport avec un aspirateur, par l'extrémité de la pipette graduée et on enlève le coton de l'autre pipette ; on fait alors passer, lentement, une certaine quantité d'air, 10 litres le plus ordinairement. Pendant le passage, il est bon, au moins en été, de refroidir l'eau qui sert

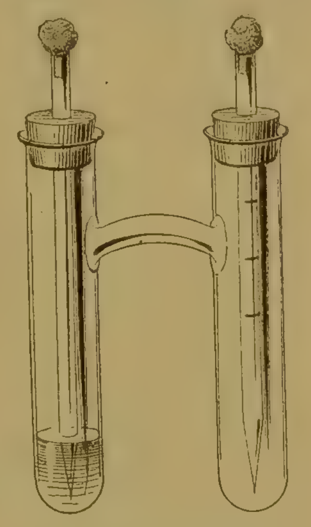


Fig. 205. — Tube de Laveran.

au barbotage (cette recommandation s'applique aussi à la méthode de Miquel). Le passage de l'air terminé, on remet en place le coton de la pipette non graduée et on rince la surface interne de cette pipette. On agite vivement, on fait passer l'eau dans la branche vide de l'appareil et, à l'aide de la pipette graduée, on ensemence, par exemple, 12 fioles de Gayon contenant de la gélatine, à raison de 1/5 de centimètre cube par fiole. Il faut savoir, qu'à la température de 22°, les germes se rajeunissent lentement, surtout dans les milieux solides. De la fin du premier mois à la fin du troisième, il reste à naître 17 à 18 pour 100 des microbes ensemencés (Miquel). *Après un mois*, on comptera donc les colonies des 12 matras ; on fera la moyenne ; on multipliera par 5000 ; on ajoutera 17 à 18 pour 100 et on aura le nombre de germes, renfermés dans un mètre cube d'air. Si l'analyse ne peut être pratiquée immédiatement après le barbotage, il est facile de conserver l'appareil dans la glace. Ajoutons enfin que, pour toutes les numérations des microbes de l'air, la gélatine peut être remplacée par la gélose-gélatine ou la gélose.

Faire une analyse quantitative d'air revient donc, dans les seules méthodes aujourd'hui employées (bourres solubles et barbotage), à faire une analyse quantitative d'eau. Pareillement, l'*étude qualitative* de l'air ne différera en rien de celle des eaux. Aussi n'insisterons-nous pas.

Nombre des germes de l'air. — Saprophytes et pathogènes.

Les résultats fournis par l'analyse, soit quantitative, soit qualitative, sont bien connus de tous. Il nous suffira donc de rappeler que les germes sont plus abondants dans les *villes* qu'à la *campagne*, dans les *vallées* que sur les *montagnes* (Pasteur).

Pendant l'hiver de 1882, un mètre cube d'air, rue Monge, renfermait 6 500 bactéries, tandis qu'il n'en contenait que 280, à Montsouris. Au printemps de la même année, il existait 3 850 bactéries dans un mètre cube d'air rue Monge et 270 à Montsouris (Miquel). Ces chiffres démontrent qu'à mesure qu'on s'éloigne du centre des villes, on voit le nombre des microbes diminuer. Les *saisons* ont aussi leur influence, comme l'indique le tableau suivant (Miquel) :

	GERMES PAR MÈTRE CUBE	
	MONTSOURIS	HÔTEL-DE-VILLE
	—	—
Hiver.	218	2 960
Printemps..	395	5 120
Été	591	5 450
Automne.	253	3 640

Inutile d'insister sur le rôle du *vent,* qui entraîne les germes plus ou moins loin, et sur celui de la pluie, qui tend à stériliser mécaniquement l'atmosphère. Notons que l'*air marin* est d'autant plus pur qu'on s'écarte davantage des côtes, ce que l'on pouvait prévoir *a priori.*

Dans les *appartements* non habités, l'air contient relativement peu de germes. Le nombre des microbes, dans les appartements habités, se montre proportionnel à celui des habitants. Dans les *hôpitaux,* les chiffres sont tout particulièrement élevés. M. Laveran a trouvé 16 200 germes, par mètre cube, dans une salle de malades du Val-de-Grâce, au moment de la visite et 37 200, au moment du nettoyage.

Notons encore la pureté de l'*air expiré,* démontrée par les recherches de MM. Straus et Wurtz. Alors que l'air ambiant contenait 20 700 bactéries par mètre cube, l'air expiré n'en renfermait que 40, soit 517 fois moins.

Au point de vue qualitatif, on sait, depuis les expé-

riences de M. Bujwid, que chaque local a, en quelque sorte, ses bactéries propres. Parmi les *saprophytes* de l'air, nous citerons : nombre de cocci ; diverses sarcines ; le b. mesentericus, le b. prodigiosus, le b. subtilis, etc. ; des streptothrix ; des penicilliums, des aspergillus, des mucors, des torulas, etc.

Pour ce qui concerne les *pathogènes*, nous renvoyons à l'alinéa suivant, car c'est surtout dans les poussières qu'on les a recherchés.

II. *Analyse bactériologique des poussières.*

1° Analyse quantitative.

L'unité, à laquelle on doit rapporter les chiffres fournis par la numération, est représentée par le gramme. On prélèvera donc un gramme de poussière, soit au dehors (sur la voie publique par exemple), soit dans les habitations (sur le plancher, dans les rainures, l'entrevous, etc.), et on le diluera dans une quantité connue d'eau stérilisée. Cette dilution constitue le point délicat de l'opération, car il est difficile de présumer la richesse en germes de l'échantillon à analyser. M. Miquel a trouvé 750 000 microbes par gramme de poussières, à Montsouris ; 1 300 000, dans un appartement de la rue de Rennes ; 2 100 000, rue Monge. M. Mazza, examinant les poussières des cafés-chantants de Turin, a compté, par gramme, de 1 580 000 à 3 170 000 germes. L'un de nous, avec les poussières d'un casernement où sévissait la fièvre typhoïde, a obtenu des chiffres plus élevés encore : de 5 500 000 à 7 000 000 microbes par gramme. La poussière des rues et des routes paraît moins riche en germes que celle des appartements. Expérimentant l'été, dans un pays chaud et sur des poussières superficielles de route, l'un de nous a trouvé, par

gramme, de 50 000 à 500 000 germes. Mais on conçoit que ces chiffres soient susceptibles de subir, suivant une foule de conditions, des variations très considérables. Comme conséquence de cette teneur extrêmement inégale en germes, il est nécessaire de faire des plaques avec des dilutions très diverses.

2° Analyse qualitative.

Les poussières renferment à la fois des saprophytes et des pathogènes. La liste des principaux *saprophytes*, extrêmement longue, serait tout à fait dénuée d'intérêt. Dans leurs analyses, MM. Kelsch et Simonin ont décelé la présence des *pathogènes* suivants : staphylocoques blanc et doré, streptocoque pyogène, b. pyocyanique, b. de Friedländer, b. coli. A cette liste, il faut ajouter le pneumocoque (Netter), le b. de la pseudo-tuberculose zoogléique (Chantemesse), le b. diphtérique (Löffler), le b. typhique, le b. de Koch (Cornet), le b. tétanique, le vibrion septique, etc...

Pour isoler ces diverses espèces, on peut s'adresser à la méthode des plaques, mais, comme dans le cas des eaux, l'opération est souvent très ardue. On recourra donc, autant que possible, aux méthodes propres à chaque espèce. Dans le cas des pathogènes, l'inoculation rendra souvent des services.

III. *Contagion par l'air.*

L'air s'épure, comme on le sait, sous l'influence de la *lumière* et de l'*oxygène*. La *dessiccation* joue un rôle préalable des plus importants, dans la destruction des germes, mais ceux-ci n'offrent pas tous la même sensibilité à son action. M. Germano range quelques bactéries pathogènes qu'il a étudiées en 4 groupes, de résistance croissante. Le premier com-

prend le vibrion cholérique, le b. pesteux, le b. typhique et le b. de Pfeiffer. Le streptocoque, le pneumocoque et le b. de Löffler sont moins fragiles. Le staphylocoque et surtout le b. de Koch supportent encore mieux la dessiccation. Enfin, les virus à spores (le virus charbonneux par exemple), se montrent éminemment résistants.

On admettait jadis que la contamination par l'air est liée à l'absorption des *poussières sèches*. Les recherches récentes de M. Flügge tendent à prouver que cette contamination se fait, au moins dans le plus grand nombre des cas, par l'intermédiaire des *particules liquides*, souillées de germes, *qui émanent* directement *du nez* et surtout *de la bouche des malades* (gouttelettes de Flügge). La vérification de cette théorie nécessite diverses *expériences intéressantes*, sur lesquelles nous devons insister. Nous étudierons successivement :

1° L'existence des gouttelettes de Flügge en général.

2° La projection de gouttelettes virulentes par les tuberculeux.

3° La comparaison des crachats tuberculeux secs et des gouttelettes bacillifères, au point de vue de leur nocuité respective.

1° Existence des gouttelettes de Flügge.

On peut la démontrer, en répétant l'*expérience* suivante, *due à M. Hübener*. On se souille la bouche avec une émulsion de b. prodigiosus. On dispose, dans la chambre où on se trouve et aux hauteurs et distances les plus variées, des boîtes de Pétri remplies de solution saline physiologique ; on parle, on tousse, on éternue. On fait ensuite des plaques avec l'eau des diverses boîtes. Il est facile de constater ainsi que

les germes sont parfois entraînés jusqu'à une distance de 12 mètres et davantage. En deux minutes, on peut en avoir projeté dans tous les points d'une pièce. On émet d'autant plus de gouttelettes qu'on parle plus haut et qu'on articule plus nettement. La prononciation des consonnes l'emporte à cet égard sur celle des voyelles ; il existe également de grandes différences suivant l'individu, le dialecte, etc. Les gouttelettes se répandent partout, même derrière le sujet en expérience. La plupart ne flottent pas dans l'air plus de 10 minutes. Les plus lourdes, c'est-à-dire les plus chargées de germes, tombent naturellement les premières. Avec la voie parlée et dans un air calme, les gouttelettes ne dépassent pas 1 à 2 mètres. Avec les courants d'air modérés des chambres ordinaires, la distance peut atteindre 3 ou 4 mètres. Il va de soi que, lors de la toux et de l'éternûment, le nombre des gouttelettes augmente et qu'elles sont projetées beaucoup plus loin.

2° Projection de gouttelettes virulentes par les tuberculeux.

Le bacille de Koch existe fréquemment dans la *salive* des tuberculeux. M. Beninde l'a rencontré 9 fois sur 20 malades ; M. Hübener l'a retrouvé sur les miroirs laryngiens. Un assistant de M. Fränkel, causant avec un tuberculeux, constata ensuite la présence des bacilles sur ses lunettes. M. Lachtchenko expose des lames à la projection de gouttelettes, de la part de 35 tuberculeux, atteints de lésions diverses : 14 fois il retrouve, sur ces lames, des bacilles de Koch. M. Heymann place des lames à 50 centimètres de la tête des tuberculeux. Sur ces lames, apparaissent bientôt des taches, qui correspondent aux gouttelettes. Elles sont d'autant plus abondantes que la toux est

plus forte et les crachats plus fluides. L'auteur distingue *trois espèces de taches*, caractérisées par une richesse différente en bacilles. 1) Les unes, correspondent à un état de dilution moyenne des *particules-mères*, venues du poumon. On peut leur reconnaître 3 zones : une zone centrale, composée de leucocytes, emprisonnés dans un réseau de mucine et de fibrine ; les bacilles y sont parfois très abondants — une zone moyenne, constituée par l'épithélium buccal et les microbes de la bouche — enfin, une zone périphérique, composée presque exclusivement de mucus. 2) D'autres taches correspondent aux particules-mères elles-mêmes. Elles sont réduites presque uniquement à la zone centrale, indiquée tout à l'heure et émanent des gouttelettes les plus lourdes, les plus riches en bacilles. 3) D'autres enfin, correspondent à une division très grande des particules-mères. Elles sont composées d'éléments plus ou moins altérés, disséminés sans ordre. Il n'existe ici aucune division nette en zones et les bacilles restent clairsemés. Ces taches émanent des gouttelettes les plus légères, les moins riches en bacilles.

Le danger des gouttelettes virulentes peut être prouvé par l'*expérimentation sur l'animal*. M. Beninde met un tuberculeux dans une cage de verre, où il a placé, à diverses hauteurs, des boîtes de Petri remplies d'eau physiologique. Le malade reste dans la cage une heure à une heure et demie et tousse de temps à autre. Le contenu des boîtes est ensuite inoculé aux cobayes, par la voie abdominale. Dans un cas, 4 boîtes sur 9 se montrèrent contaminées. L'auteur a varié cette expérience de la façon suivante. Il laisse séjourner un tuberculeux pendant 5 heures dans la cage et aspire ensuite l'air, qu'il fait barboter dans de l'eau physiologique. Celle-ci infecte le cobaye.

M. Lachtchenko place des cobayes dans une boîte

métallique close, munie d'un trou auquel on a adapté un tube évasé. Pendant 14 jours et durant 1 heure 1/2 à 2 heures chaque jour, il fait tousser des tuberculeux devant le tube. Sur 4 cobayes, soumis à ce mode d'infection, 2 présentèrent de la tuberculose des ganglions bronchiques. Voici encore une autre expérience du même auteur. On met un cobaye dans une caisse close, en ne laissant sortir que la tête de l'animal. Celui-ci est exposé, à plusieurs reprises, aux effets de la toux d'un tuberculeux. On réalise assez souvent ainsi la tuberculose des ganglions bronchiques, parfois la tuberculose pulmonaire, accompagnée d'une éruption discrète sur l'épiploon et le mésentère. Ces différentes expériences ne donnent certes pas de résultats aussi schématiques que les pulvérisations de crachats humides, telles que les pratiquait M. Koch, mais elles ont le grand avantage de reproduire *exactement* le mode de contamination naturelle.

3° Nocuité comparée des crachats secs et des gouttelettes bacillifères.

M. Stricker prend des crachats très riches en bacilles et très virulents, même après dessiccation (cette virulence est constatée par l'inoculation intrapéritonéale, chez le cobaye). Avec ces crachats desséchés, il n'arrive que *très difficilement* à contaminer les cobayes, par inhalation. A moins de soulever en masse des poussières virulentes et cela à maintes reprises, comme l'a fait jadis M. Cornet, c'est-à-dire, à moins de s'éloigner absolument des conditions ordinaires d'infection, on ne réussit presque jamais à contaminer les cobayes au moyen des crachats secs. Cette difficulté contraste vivement avec les résultats que donnent les gouttelettes de Flügge. Aussi M. Flügge et

ses élèves concluent-ils que *les gouttelettes sont seules dangereuses pratiquement*, et cela, non seulement en matière de tuberculose, mais encore dans les diverses maladies des premières voies et de l'appareil broncho-pulmonaire.

CHAPITRE III

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DU SOL

Les microbes du sol sont extrêmement nombreux et appartiennent à des espèces très diverses. A la surface, on ne rencontre que des aérobies ; dans la profondeur, on ne trouve que des anaérobies (stricts ou facultatifs). Notons toutefois que, si les anaérobies stricts ne peuvent se développer dans les régions superficielles, leurs spores y sont, par contre, largement représentées (b. tétanique, vibrion septique).

I. *Numération des microbes du sol.*

Dans le cas d'un *prélèvement en surface,* l'échantillon de terre sera recueilli aseptiquement, avec une spatule ou une cuiller stérilisées. Pour les *prélèvements profonds,* on aura recours à l'appareil spécial inventé par M. Fränkel (fig. 206). De toutes façons,



Fig. 206. — Appareil de Fränkel.

la terre sera broyée finement (au besoin avec du sable stérile) et diluée dans une grande quantité d'eau. On agitera fortement, de manière à obtenir une émulsion le plus homogène possible et on fera des plaques. Ces plaques, destinées à l'analyse quantitative, pourront

servir également à isoler un certain nombre des espèces présentes. De même que pour les eaux et l'air, il faut savoir qu'on ne tient pas compte, dans ce mode opératoire, des anaérobies, des thermophiles, de divers zymogènes, etc. Mais c'est, avant tout, en raison de la difficulté d'obtenir une bonne dilution, que les *résultats* fournis ne sont que *grossièrement approximatifs*.

On arrive cependant à se rendre compte que *les microbes*, très nombreux dans les couches superficielles, où ils sont retenus en vertu d'un véritable phénomène de filtration, *décroissent* ensuite *irrégulièrement avec la profondeur*. Parfois, entre deux couches habitées, on rencontre une couche stérile. Il est facile de constater que, l'hiver, sous la double influence de l'abaissement de la température et de la pauvreté des aliments, le nombre des germes superficiels diminue notablement. Dans les cimetières, la diminution en profondeur est toujours moins rapide qu'ailleurs ; à $2^{m},50$, on trouve encore, par gramme de terre, plusieurs millions de microbes. La *distribution des espèces* est régie surtout par celle des aliments ; à la surface croissent les variétés qui exigent une nourriture abondante ; dans la profondeur se développent les ferments nitriques, aux besoins si restreints. Entre les deux, figurent tous les intermédiaires (Duclaux).

Les chiffres suivants donneront une idée de la *richesse* en microbes *suivant la profondeur* envisagée. M. Miquel a trouvé, par gramme de terre sèche, au cimetière Montparnasse :

Nombre des germes.	A la surface.	29 000 000
	A $0^{m},50$.	16 000 000
	A 1 mètre.	14 600 000
	A $1^{m},50$.	6 900 000
	A 2 mètres.	4 600 000
	A $2^{m},50$.	5 900 000

D'autres chiffres, empruntés également aux travaux de M. Miquel, font connaître la double *influence de la profondeur et de la dessiccation.*

	TERRE DU CHAMP DE MARS (Bactéries par gramme)	
	TERRE HUMIDE	TERRE DESSÉCHÉE 48 h. à 30°
	—	—
A la surface. . . .	4 000 000	850 000
A 1 mètre.	305 000	66 000
A 2 mètres.	100	1 000

II. *Saprophytes et pathogènes du sol.*

Les bactéries du sol appartiennent, avons-nous dit, à des espèces nombreuses et variées. Parmi les *saprophytes,* nous citerons : le b. mycoïdes, le b. muscoïdes, le b. subtilis, le b. megatherium, le b. mesentericus ; divers thermophiles ; des nitrifiants ; des dénitrifiants ; nombre de streptothrix, etc. Parmi les *pathogènes,* les uns représentent des *hôtes habituels* du sol, tels le b. de Nicolaïer et le vibrion septique. D'autres se rencontrent seulement à l'état d'*hôtes temporaires* (b. charbonneux, vibrion cholérique, b. d'Eberth, b. de Koch, etc.). Ces derniers peuvent cependant persister dans la terre pendant un temps quelquefois fort long ; la spore charbonneuse y vit des années (Pasteur), le b. typhique se conserve jusqu'à 5 mois et demi, à 50 centimètres de profondeur (Grancher et Deschamps), le b. tuberculeux résiste plus d'un an *dans les cadavres enfouis* (Schottelius). Les travaux de M. Lösener ont montré d'autre part que, chez les *animaux enterrés,* le v. cholérique et le tétragène pouvaient résister 28 jours, le b. pyocyanique 33, le b. typhique 96, le b. du rouget 234 et la spore charbonneuse 1 an.

III. Isolement de quelques espèces pathogènes.

Bactéridie charbonneuse.

On emploiera le *procédé de Pasteur*. Il consiste à délayer un peu de terre dans de l'eau stérilisée et, après avoir laissé déposer les grosses particules, à décanter le liquide qui surnage. Le dépôt, abandonné en verre conique par ce liquide, est aspiré en pipettes, que l'on scelle et porte, pendant 20 minutes, dans un bain-marie réglé à 90°. On élimine ainsi les bactéries non sporulées. Le contenu des pipettes sert à ensemencer de la gélatine, qui est coulée en boîtes de Petri. On se débarrasse par ce moyen du vibrion septique et du b. du tétanos (anaérobies, comme on le sait). On examine avec soin les colonies qui se développent en gélatine. Celles qui présentent les caractères des colonies charbonneuses sont recueillies, ensemencées sur divers milieux et finalement inoculées à des animaux réceptifs, tels que le cobaye et la souris.

Vibrion septique.

Le vibrion septique est *facile à isoler*. Si on inocule, sous la peau de quatre à cinq cobayes, une petite quantité de terre de rue ou de jardin, il y a les plus grandes chances pour qu'un ou deux au moins de ces animaux succombent à la septicémie de Pasteur. Le vibrion sera recherché, à l'autopsie, comme il a été indiqué ailleurs.

Bacille de Nicolaïer.

L'*isolement* du bacille tétanique est *beaucoup moins commode* à réaliser. L'inoculation, sous la peau du

cobaye, constitue un moyen infidèle ; à moins qu'on n'opère avec une terre particulièrement tétanigène, les animaux succombent le plus souvent à une forme quelconque de septicémie. Il est bien préférable de recourir au *procédé* suivant, *indiqué par MM. Vaillard et Vincent*. On délaiera, dans de l'eau stérilisée, la terre qu'on soupçonne devoir contenir le b. de Nicolaïer et on laissera déposer. Le liquide décanté sera ensuite renfermé dans des ampoules scellées, que l'on portera pendant 2 minutes à 100°. Puis, on cultivera le contenu de ces ampoules dans le vide, en bouillon fraîchement préparé. Au bout de quelques jours, le bouillon sera examiné au microscope, au point de vue de la présence caractéristique des formes en épingle. Souvent le résultat se montre négatif ; il faut alors recommencer l'épreuve avec un autre échantillon de terre. Ailleurs, le b. du tétanos se trouve associé à des espèces non sporulées, dont il est facile de l'isoler, en répétant à deux ou trois reprises le chauffage et la culture dans le vide. Mais d'autres fois, c'est au vibrion septique qu'il est mélangé ; il devient alors nécessaire de pratiquer une séparation anaérobie, à l'aide, par exemple, du tube de Vignal. Au bout de cinq ou six jours, les colonies du b. de Nicolaïer apparaissent sous forme de sphères nuageuses, d'où partent de fins rayons ; la gélatine ne se liquéfie que tardivement. Les colonies du vibrion septique, plus précoces, se montrent dès le deuxième ou le troisième jour et la gélatine est liquéfiée presque aussitôt.

Bacille d'Eberth et colibacille.

La recherche du bacille typhique se fera comme à l'ordinaire ; on aura soin d'ensemencer un très grand nombre de plaques. La recherche du colibacille est infiniment plus aisée ; on emploiera, de préférence, le procédé de M. Péré.

IV. *Étude spéciale de certaines espèces saprophytes.*

Un certain nombre de saprophytes du sol présentent un grand *intérêt d'ordre général.* Ce sont, avant tout, les microbes modificateurs de la matière organique morte et les bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes.

a) *Modificateurs de la matière organique morte.*

En se décomposant, la matière organique perd principalement de l'O et de l'H, le C augmente. Il se produit CO^2, AzH^3 et des résidus humiques ; CO^2 contribue à former du carbonate de chaux, AzH^3 devient une source de nitrates, la substance humique fixe les bases alcalines et retourne plus ou moins vite à l'état de composés plus simples. Nous citerons, comme exemples des transformations de la matière organique, le cas des *fumiers* et celui de la *houille.*

Microbes des fumiers (Gayon et Dupetit). — Les fumiers subissent des modifications différentes, suivant qu'ils sont exposés ou non au contact de l'air. Si on place du fumier de cheval dans deux caisses, l'une ouverte, l'autre fermée, on constate, dans la première, le développement d'une foule d'espèces aérobies et, comme fait dominant, la *transformation* de la matière organique *en ammoniaque* ; dans le deuxième, un dégagement énorme de gaz (CO^2, CH^4, H) et la *fermentation de la cellulose.* De semblables phénomènes se combinent et se succèdent sans cesse dans le sol. Rappelons que M. Gayon a décrit un organisme qui fait fermenter le coton ; il se dégage alors CO^2 et CH^4 et on trouve comme résidu un charbon noirâtre. Ces phénomènes nous conduisent à l'étude de la houille.

Microbes de la houille. — Pour constater, au microscope, la présence de *bactéries (fossiles)* dans la houille, on choisira un petit fragment ne présentant aucune fissure. On le polira parfaitement, sur une face, au moyen de potée d'émeri très fine (l'opération demande deux heures environ) ; puis, la face polie sera collée sur une lame de verre, avec du baume de Canada. On usera ensuite le côté opposé, jusqu'à ce que l'on obtienne une lamelle très mince. Comme celle-ci n'est pas encore transparente, on achèvera de l'user au moyen d'un bouchon imprégné de potée d'émeri, délayée dans de la glycérine. On montera enfin dans le baume. (Renseignements obligeamment fournis par M. Bernard Renault, aux importants travaux duquel nous renvoyons, pour tout ce qui concerne la formation de la houille.)

b) *Nitrifiants.*

Les *conditions de la nitrification* sont les suivantes. Il faut :

1° Une *matière azotée,* préalablement transformée en AzH^3.

2° De l'*oxygène.* Il y a proportionnalité entre l'AzO^3H formé et l'O présent ; en l'absence d'O, les nitrates formés sont décomposés.

3° De l'*humidité.* La nitrification n'a pas lieu si la quantité d'eau est insuffisante et, inversement, la dénitrification se produit si cette quantité devient trop abondante.

4° Une *température favorable* (optimum expérimental : 37°).

5° Une *alcalinité légère.* La nitrification fait défaut dans la terre de bruyère (acide). Une trop grande basicité est également nuisible (c'est le cas des terres qui viennent d'être chaulées).

6° L'*obscurité*. La lumière ralentit considérablement la nitrification.

7° Des *microbes spéciaux*, dont l'étude complète a été faite ailleurs (ferments nitreux et ferment nitrique).

On s'efforce de réaliser toutes les conditions indiquées, lorsqu'on veut établir une *nitrière artificielle*. A cet effet, on mélange de la terre meuble (qui contient K et Ca) avec du fumier (AzH^3) ; on bâtit ainsi des murs étroits, qu'on arrose fréquemment, mais pas trop abondamment avec de l'urine (AzH^3). Les nitrates s'effleurissent à la surface la plus exposée au vent, en raison du renouvellement d'O que celui-ci occasionne.

c) *Dénitrifiants*.

Étudiés par MM. Gayon et Dupetit, Schlösing, Déhérain et Maquenne, Stutzer, etc. Ils décomposent les nitrates et mettent l'Az en liberté. Deux espèces bacillaires, l'une plus active que l'autre, ont été isolées du sol par MM. Gayon et Dupetit. A l'air, elles ne déterminent aucune fermentation ; à l'abri de l'air, elles produisent Az et CO^2, si le milieu est riche ; du protoxyde et surtout du bioxyde d'azote, s'il est pauvre. On comprend donc qu'une fumure trop copieuse, ou l'introduction d'une quantité considérable d'hydrates de carbone, amèneront des phénomènes de dénitrification énergiques dans le sol. L'arrosage avec l'acide sulfurique permettra d'arrêter plus ou moins complètement cette dénitrification. L'hygiéniste doit au contraire la favoriser, dans certaines conditions, par exemple lorsqu'il s'agit de désalpêtriser une muraille (Vallin).

V. *Bactéries des légumineuses.*

Cultivant diverses graminées dans des sols artifi-

ciels, additionnés de doses variées de nitrate de chaux, MM. Hellriegel et Willfarth ont constaté que le développement des plantes se montre d'autant meilleur et la proportion d'Az assimilée d'autant plus considérable, que la quantité de nitrate fournie est plus abondante. Pour les légumineuses, au contraire, une telle proportionnalité n'existe pas et on peut observer la *fixation d'azote*, alors même qu'on n'a pas donné de nitrates. Les deux savants allemands ont démontré que cette fixation se trouvait ici en rapport intime avec la présence de nodosités radicales, produites par des bactéries spéciales, dont nous avons parlé antérieurement. Les travaux de M. Mazé (précédés de ceux de MM. Bréal, Schlösing et Laurent, Beyerinck et Prazmowski) ont permis d'isoler des plantes et du sol les bacilles radicoles et de les étudier en détail.

D'après M. Mazé, les caractères de la *race normale*, c'est-à-dire de la race *récemment issue des nodosités*, sont les suivants. Cultivés à 20° ou 25°, dans le bouillon Mazé ou la gélose correspondante, ces microbes se présentent tout d'abord sous l'aspect de bâtonnets mobiles, puis, des formes courtes et grosses apparaissent. Accoutumés à pousser sur gélose à 35°, les bacilles donnent des amas, d'apparence ramifiée (fig. 207), mais jamais de véritables formes de streptothrix. Sur gélose, additionnée d'1 pour 100 d'acides tartrique ou



Fig. 207. — Bactéries des légumineuses. Amas d'aspect rameux.

oxalique, on obtient des types piriformes, avec contenu vacuolaire. Enfin, sur gélatine acide et à 35°, on observe de faux rameaux moniliformes (fig. 208). Les microbes pénètrent dans la plante à l'état de coccobacilles mobiles et sécrètent ensuite une substance muqueuse, qui leur forme une gaine pseudo-mycélienne. Quand la sève circule, elle dissout les mucosités, et les coccobacilles, libres en milieu acide, deviennent pseudo-rameux. Les bactéries radicoles se décolorent par le Gram.



Fig. 208. — Bactéries des légumineuses. Faux rameaux moniliformes.

Si on cultive, ainsi que nous l'avons dit ailleurs, les bacilles des légumineuses sur de la gélose au bouillon de haricots sucré, répartie en couche très mince (4 millimètres au plus) dans un matras à fond plat et qu'on fasse circuler un courant d'air (sans azote combiné), on observe un dépôt muqueux, croissant jusqu'au 12e jour. La culture dégage une odeur pénétrante, mais il n'y a pas formation d'AzH^3. Si on cultive les mêmes microbes en milieu Mazé liquide, le milieu se gélatinise progressivement ; il se fige, coule mal et est devenu demi-solide après 15 jours. Dans les deux cas, on note la consommation du sucre et une fixation corrélative d'azote. Cette fixation nécessite absolument la présence d'un milieu bien aéré, contenant de l'azote combiné et au moins 2 pour 100 de saccharose. Dans les conditions les plus favorables, les bactéries radicoles fixent 1 partie d'Az pour 200 parties de saccharose consommé.

On peut obtenir, par l'isolement (du sol), ou *par divers moyens, des races bien différentes* de la race

normale. Ainsi, dans l'azote pur, les microbes des légumineuses ne se développent pas, mais demeurent vivants. Si on fait des cultures après 15 jours ou 3 semaines, on obtient successivement deux races : l'une bacillaire (fig. 209) et l'autre arrondie (fig. 210). Alors que la race normale ne liquéfie pas la

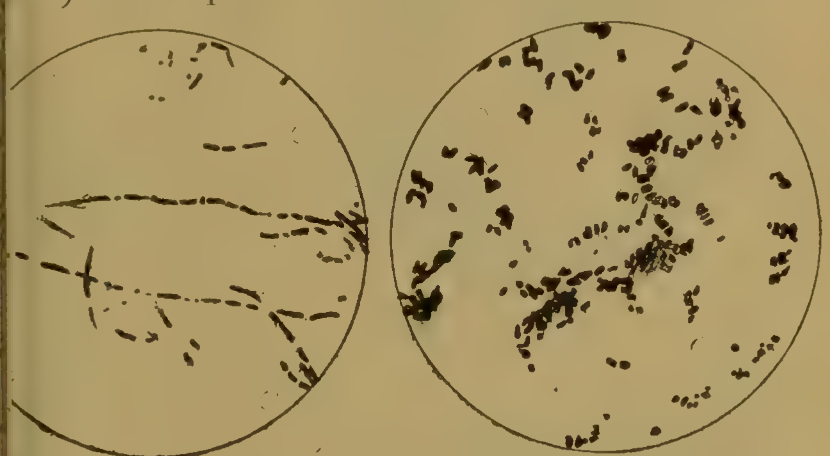


Fig. 209. — Bactéries des légumineuses. Race bacillaire.

Fig. 210. — Bactéries des légumineuses. Race arrondie.

gélatine, donne du mucus et, inoculée sur des vesces de Narbonne, produit des nodosités en 9 à 12 jours, la *race bacillaire* liquéfie lentement la gélatine, ne donne pas de mucus et ne produit pas de nodosités par inoculation. La *race arrondie* liquéfie rapidement la gélatine et n'engendre, elle aussi, ni mucus ni nodosités. Par contre, le mélange des deux races se montre susceptible de donner à la fois du mucus et des nodosités. Ajoutons qu'un des types radicoles, isolés du sol par M. Mazé, revêt (spontanément, ou par culture dans des milieux acides à 39°-40°) la *forme oospora* (fig. 211).

Les bactéries des légumineuses s'isolent aisément des nodosités ; pour les extraire de la terre, il faut recourir à un procédé fort compliqué, pour l'étude

duquel nous renvoyons aux travaux de M. Mazé. On rencontre principalement dans le sol deux bacilles, l'un mobile, l'autre immobile. Ils n'infectent les légumineuses que s'ils sont réunis.

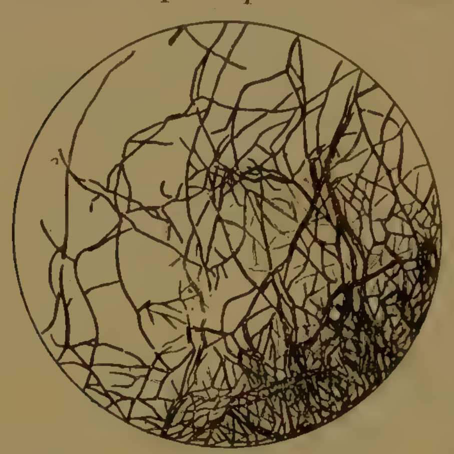


Fig. 211. — Bactéries des légumineuses. Forme oospora.

On a tenté d'appliquer les données précédentes à l'agriculture. La *nitragine*, de MM. Nobbe et Hiltner, représente un mélange des bactéries de 17 espèces de légumineuses. Les cultures sont englobées dans une gelée, qui fond à 33°. Un flacon de 300 centimètres cubes sert à ensemencer 20 ares. Les résultats se sont montrés fort médiocres. Il est indispensable, en effet, que les microbes radicoles soient transportés dans une terre qui possède absolument la même réaction que celle d'où ils proviennent. Sinon, ils perdent leurs propriétés pathogènes, comme M. Mazé l'a constaté directement. Ils ont également à compter dans le sol avec la concurrence vitale, qui peut les faire disparaître.

CHAPITRE IV

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DES ALIMENTS

Nous distinguerons les aliments d'origine animale et les aliments d'origine végétale.

I. *Aliments d'origine animale.*

Nous en distrairons le lait et ses dérivés, dont l'étude est assez importante pour constituer un chapitre à part et nous envisagerons, tour à tour, l'analyse bactériologique de la viande fraîche, celle des viandes salées, fumées, etc., destinées à être consommées après un certain temps et celle des viandes conservées en boîtes. Nous dirons ensuite un mot de quelques autres aliments, tels que les huîtres et les moules.

A) Analyse bactériologique de la viande fraîche.

Les *accidents consécutifs à l'ingestion de certaines viandes*, sont loin de constituer des raretés ; à leur occasion, le bactériologue peut être amené à donner un avis dont dépendent des intérêts multiples. Nous croyons donc devoir entrer dans quelques détails au sujet de ces accidents, sur lesquels les divers traités de bactériologie sont toujours restés muets et qui peuvent se répartir en *3 groupes*.

1) *Le premier* comprend les faits dans lesquels une viande saine a été souillée par un microbe de

provenance extérieure [b. termo (Nauwerk), bacillus cellulœformans (Hamburger)]. Dans le cas, que rapporte M. Levy, de la viande, mise à la glacière, y fut infectée par un proteus virulent, qu'on retrouva en abondance dans la glacière elle-même.

2) *D'autres fois,* les accidents sont provoqués par la consommation de viandes émanant de sujets infectés et l'examen bactériologique permet d'isoler un organisme pathogène connu. C'est ainsi que M. Denys a rencontré le staphylocoque virulent dans la viande d'une vache, morte de fièvre vitulaire. De même, M. Pouchet a retrouvé, dans la viande suspecte d'un porc, le bacille du hog-choléra, qui sévissait épidémiquement sur la race porcine de la région, etc...

3) *Un troisième groupe* comprend également des infections qui résultent de l'usage de la viande d'animaux malades. Mais ici, l'examen de cette viande (ou des viscères incriminés), ainsi que celui des selles ou des vomissements des sujets atteints, révèlent constamment la présence soit du *b. enteritidis* de Gärtner, soit d'organismes très voisins, sinon identiques, tels que ceux qui ont été isolés par MM. Karlinski (chèvre), Günther et Silberschmidt (porc), Fischer, Känsche, Holst, Poëls, van Ermengem (vache).

Les *caractères principaux du b. enteritidis* sont les suivants. C'est un organisme fort analogue au colibacille. Il offre l'aspect de bâtonnets mobiles ; la mobilité est due à des cils vibratiles assez longs, au nombre de 5 à 8. Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et se décolore par la méthode de Gram. Les caractères de culture sont à peu de chose près ceux du b. d'Escherich. Toutefois, le bouillon ensemencé ne dégage pas d'odeur fécaloïde et on n'y observe pas la formation d'indol. Le lait n'est pas

coagulé ; au contraire, au bout de 8 à 10 jours, il devient moins opaque et même presque transparent. Le glucose et le lactose fermentent. A l'abri de l'air, le développement reste peu marqué. Le chien, le chat et la poule sont réfractaires à tous les modes d'inoculation. Par contre, la souris, le cobaye et le lapin se montrent très réceptifs ; l'injection du suc des viandes contaminées ou des cultures pures, les tue aisément, même par la voie sous-cutanée. La chèvre, le mouton et le pigeon sont également sensibles, bien qu'à un moindre degré. Suivant l'espèce en jeu et la dose inoculée, la mort survient au bout de 2 à 5 jours. A l'autopsie, on observe une entérite très marquée, avec prédominance des lésions au niveau de l'intestin grêle, où l'on constate la présence d'une vive hyperémie, d'hémorragies et parfois même d'ulcérations. Le bacille pathogène se retrouve dans le contenu gastrique et intestinal. Il existe en culture pure dans le foie, la rate, le sang du cœur et la moelle des os. *Chez l'homme,* il peut s'isoler, pendant la vie, des selles et des matières vomies et à l'autopsie du sang du cœur et des viscères. Nous devons ajouter que le bacille de Gärtner sécrète une toxine active, qui ne perd pas son efficacité alors même que la viande a été cuite pendant 1 heure 1/2 (Fischer). Cette toxine tue les animaux avec les mêmes symptômes que les cultures vivantes.

B) Analyse bactériologique des saucisses, jambons, etc.

Les saucisses, les viandes salées et fumées, comme le jambon, les pâtés de gibier recouverts de graisse, les boudins de sang et de foie, le poisson salé, en un mot, nombre de produits alimentaires, destinés à être consommés un certain temps après leur préparation, sont susceptibles de donner lieu à une série par-

ticulière d'intoxications, désignées sous le nom générique de *botulisme* et produites par le *b. botulinus* de M. van Ermengem.

Le b. botulinus a été découvert par ce savant, lors de la célèbre épidémie d'Ellezelles, dans un jambon, point de départ des accidents, ainsi que dans la rate et le contenu du tube digestif d'une des victimes. Il se développe, au sein des viandes, comme en un milieu de culture et y sécrète une toxine extrêmement active, à laquelle sont dus tous les symptômes observés.

Les *caractères du microbe* sont les suivants. C'est un bâtonnet, exclusivement anaérobie et d'assez grande taille. Il est droit, avec des extrémités un peu arrondies. Dans les milieux défavorables, on observe fréquemment des formes d'involution (bacilles renflés à l'une de leurs extrémités, formes en massue ou en poire, etc...). Le microbe de van Ermengem donne naissance à des spores, généralement terminales, mais parfois médianes ; spores ovales et plus larges que le bâtonnet lui-même. Celui-ci se montre mobile ; il est muni de 4 à 8 cils, très grêles, implantés irrégulièrement, difficilement colorables par la méthode de Löffler, mais facilement imprégnables par l'argent. Le bacille se colore bien à l'aide des méthodes habituelles et prend le Gram.

Un certain degré d'alcalinité est nécessaire pour obtenir des *cultures* abondantes. La température la plus favorable à la croissance s'étend de 20° à 30°. En plaques de gélatine glucosée, on observe, au bout de 4 à 6 jours, des colonies arrondies, transparentes, brun clair, formées (au microscope) de gros grains réfringents, continuellement en mouvement, surtout dans les parties périphériques. Il existe un petit cercle de liquéfaction autour de chacune d'elles. Plus tard, ces colonies augmentent de volume, devien-

nent opaques et ne présentent plus sur leurs bords qu'une zone limitée de grains mobiles ; parallèlement, on voit la liquéfaction progresser. En tubes de gélatine glucosée, on observe, le long de la piqûre, de petites masses arrondies, blanchâtres, offrant des prolongements en dendrites, lorsque le milieu est peu consistant. Ces masses commencent à 2 ou 3 centimètres au-dessous de la surface ; tout autour, la gélatine se liquéfie peu à peu. Les gaz, très abondants, disloquent bientôt le milieu nutritif. Finalement, celui-ci se trouve totalement digéré et on observe, au fond du tube, un dépôt floconneux, blanchâtre, dégageant de grosses bulles gazeuses. Dans la gélose glucosée, l'aspect n'offre aucun caractère spécial ; le milieu ne tarde pas à être disloqué par une quantité énorme de gaz. Notons que les cultures en gélatine et en gélose manifestent une odeur butyrique assez accentuée.

Sur pomme de terre, ainsi qu'à la surface de la gélose ou de la gélatine ordinaires, le développement demeure peu marqué. Le lait ne change pas d'aspect et ne se coagule jamais. Les cultures recèlent une *toxine* très active, la *botuline*, dont nous avons parlé ailleurs et qui produit des effets identiques à ceux que détermine l'inoculation du bacille lui-même.

Les *animaux réceptifs* sont : le chat, le singe, la souris, le cobaye, le lapin et le pigeon. Après inoculation sous-cutanée de culture ou de toxine, à dose modérée, on observe, chez le chat, une mydriase considérable ; des modifications des sécrétions bucco-pharyngées ; diverses parésies ; du prolapsus de la langue ; de l'aphonie ; de la dysphagie ; de la toux croupale ; de la rétention des urines, des fèces, et de la bile... etc. Chez le pigeon, on note de la parésie des ailes, du ptosis et de l'inégalité pupillaire. L'absorption, par la voie digestive, de petites quantités de culture ou de botuline provoque des accidents caractéris-

tiques chez le singe, le cobaye, le lapin et la souris; alors que le chien et le chat peuvent ingérer des quantités considérables de l'une ou de l'autre sans manifester de symptômes graves.

Nous avons mentionné précédemment l'*antitoxine botulique* et sa triple action préventive, antitoxique et curative.

C). Analyse bactériologique des viandes conservées en boîtes.

Ainsi que l'ont établi les travaux de M. Vaillard, une conserve peut être dangereuse par ce qu'elle a été fabriquée avec des viandes malsaines (animaux surmenés ou malades) — parce que la viande a été manipulée malproprement, ou qu'un temps trop long s'est écoulé entre l'emboîtage et la stérilisation — ou, encore, parce que les boîtes ayant été « fuitées » à l'autoclave, soudées à nouveau après plusieurs jours, puis « représervées », la viande s'est altérée dans l'intervalle; — elle peut enfin être dangereuse parce qu'elle a été stérilisée d'une manière insuffisante. Dans ce dernier cas, l'expertise bactériologique montrera des *microbes vivants*, dans les trois autres, elle révélera la présence de *cadavres de microbes*.

1° *Recherche des microbes vivants.*

M. Fernbach conseille de liquéfier la gelée de la conserve, en plaçant la boîte au bain-marie (30°-35°). Un point limité de la surface de cette boîte est ensuite stérilisé au moyen d'une flamme de gaz et on fore une petite ouverture, en enfonçant brusquement un poinçon flambé. Avec une pipette stérilisée, on puise alors la gelée et on pratique des ensemencements, les uns aérobies, les autres anaérobies. Ce procédé a l'inconvénient de ne faire porter l'examen

que sur la gelée et la graisse liquéfiées. Mieux vaut, à l'exemple de M. Vaillard, ensemencer des parcelles de viande, prélevées aseptiquement au centre de la conserve. M. Vaillard conseille également d'aérer le contenu de la boîte, au moyen de pertuis percés dans le couvercle et recouverts d'ouate stérile, puis de porter à l'étuve. Si la stérilisation a été insuffisante, la conserve est bientôt envahie par une végétation bactérienne intense, qui débute au niveau de la tranche immédiatement exposée au contact de l'air et gagne, de proche en proche, jusqu'aux parties profondes. Ce procédé se prête uniquement, cela va sans dire, à la recherche des microbes aérobies ; les anaérobies seront décelés à l'aide d'ensemencements à l'abri de l'air.

M. Vaillard est arrivé à démontrer la présence de microbes vivants dans 70 et même 80 pour 100 des boîtes examinées. Les espèces qu'il a isolées sont : divers coccus, faciles à détruire par des températures qui n'excèdent pas 80° et dont l'existence prouve que la stérilisation des conserves est parfois fort mal faite ; le proteus vulgaris ; le b. termo ; le b. subtilis ; et les b. mesentericus vulgatus, ruber et fuscus, susceptibles d'intervenir activement dans les phénomènes de putréfaction. Le b. enteritidis et le b. botulinus n'ont jamais été rencontrés ; il ne s'ensuit pas, bien entendu, que ces espèces ne puissent jamais s'y trouver.

2° *Recherche des cadavres de microbes.*

Il suffit de faire des frottis sur lames, avec les fibres musculaires et la gelée ; on sèche, on colore, on lave et on examine. Si quelques rares formes microbiennes apparaissent çà et là, elles trahissent une défectuosité légère dans le mode de préparation de la conserve, mais celle-ci n'en pourra pas moins être considérée comme de bonne qualité. Si, au contraire, chaque champ microscopique renferme

des germes, à plus forte raison si chaque champ révèle, comme dans quelques-uns des examens de M. Vaillard, plusieurs centaines de germes, il est évident qu'on se trouve en présence, soit d'une maladie infectieuse ayant amené la mort de l'animal, soit d'une manipulation malpropre, soit enfin d'un commencement de putréfaction avant la représervation ; la conserve doit alors être rejetée. L'étude histologique des fibres musculaires, en indiquant la disparition de la striation longitudinale ou transversale, pourra fournir des arguments en faveur de le première de ces hypothèses.

Ajoutons que l'expérimentation sur les animaux (inoculation, par ingestion, chez les souris, les rats, les jeunes chats ; inoculation sous-cutanée de macérations à diverses espèces) pourra, dans certains cas, compléter avantageusement l'expertise microscopique, en révélant la présence de poisons solubles.

D) Analyse bactériologique des huîtres, des moules... etc.

En dehors des cas d'intoxication légère, relevant d'une prédisposition spéciale, ou des accidents causés par les huîtres avariées, les symptômes, provoqués par l'ingestion des huîtres saines (manifestations dysentériformes ou cholériformes ; fièvre typhoïde ;... etc.), reconnaissent pour origine le séjour de celles-ci dans des eaux contaminées. C'est la conséquence forcée du choix habituel de l'emplacement des parcs (embouchure des fleuves, proximité des ports). L'huître n'intervient que comme simple véhicule des microbes pathogènes et la nature des bactéries présentes détermine seule la nature des accidents. L'*examen* bactériologique d'une huître *se ramène* en somme, *à une analyse d'eau*. On pratiquera donc l'isolement des microbes renfermés dans l'eau que contient l'huître.

Le b. coli, le b. d'Eberth, le vibrion du choléra seront recherchés, au cas échéant, à l'aide des procédés spéciaux, indiqués ailleurs.

Ce que nous venons de dire s'applique également aux troubles que détermine parfois l'ingestion des moules, de divers coquillages... etc. Il est démontré aujourd'hui que l'époque du frai et l'usage des vases de cuivre ne sont pour rien dans ces accidents et que la qualité de l'eau, dans laquelle vivent les animaux, régit seule les troubles qu'ils occasionnent (Mosny).

II. *Aliments d'origine végétale.*

Les aliments d'origine végétale sont très rarement le point de départ d'accidents imputables à une cause microbienne. Il nous suffira de mentionner les résultats qu'a fournis l'analyse bactériologique, à l'occasion des *empoisonnements par la pomme de terre*. Ceux-ci revêtent le plus souvent la symptomatologie de l'intoxication par la solanine. La production d'alcaloïde aux dépens de la pomme de terre serait, pour M. Weil, le résultat d'une action bactérienne, due aux deux *b. solaninifera* (colorabile et non colorabile). D'autres phénomènes, de nature différente et de pronostic plus bénin, paraissent causés par le *micrococcus imperator*, produisant, au sein du parenchyme, des foyers de pourriture que rien ne traduit à l'extérieur (Roze). L'ingestion d'*artichauts* est parfois suivie d'accidents de gastro-entérite, étudiés à l'hôpital Aubervilliers par M. Roger. Ils semblent sous la dépendance du *colibacille*, ou plutôt d'une variété de colibacille qui colore ces légumes en vert. Il nous suffira de mentionner, en terminant, la possibilité d'une intervention microbienne dans l'étiologie du fabisme (Cipriani), de la pellagre (Carraroli)... etc.

CHAPITRE V

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DU LAIT, DU BEURRE ET DES FROMAGES

I. *Étude bactériologique du lait.*

Les microbes, susceptibles d'être rencontrés dans le lait, appartiennent à des espèces très variées qu'on peut, pour la clarté de la description, diviser en : *saprophytes, chromogènes, zymogènes, pathogènes, peptonisantes* et *toxigènes*.

Microbes saprophytes.

Ils n'offrent rien de bien intéressant à mentionner. Ce sont des organismes du tube digestif des herbivores, du sol, des poussières... etc. Ceux qu'on note le plus fréquemment appartiennent au groupe du b. subtilis et du b. mesentericus.

Microbes chromogènes.

Nous n'étudierons que ceux qui produisent les laits colorés.

Lait bleu.

On sait que le *phénomène du lait bleu,* décrit pour la première fois par Reiset, consiste dans l'apparition d'une teinte bleue, tantôt continue, tantôt sous forme d'anneau ou de marbrures, qui se manifeste à la surface du lait. Cette coloration est due au développe-

ment d'un *microbe spécial, le b. cyanogène* (ou b. du lait bleu). C'est un petit bâtonnet aérobie, mobile, se décolorant par la méthode de Gram et poussant fort bien dans tous les milieux. Le bouillon se trouble rapidement et prend une teinte fluorescente, d'un vert bleu sombre. A la surface de la gélatine (plaques), on voit naître des colonies, ordinairement lobées et d'un vert bleu sombre également; il ne se produit pas de liquéfaction. Sur gélose, c'est un dépôt gris, entouré d'une zone verdâtre. Sur pomme de terre enfin, on observe une couche d'un gris sale; tout autour, le milieu se colore en bleu noir. Le *pigment vert fluorescent,* formé par le b. cyanogène, paraît identique à celui du pyocyanique et des divers « bacilles verts fluorescents ». La coloration bleue du lait est due à un composé insoluble dans les dissolvants ordinaires, non modifié par les acides et virant au rouge par les alcalis (*pigment gris*). Le b. cyanogène produit, en lait stérilisé, un pigment gris qui présente les réactions précédentes, mais n'acquiert point, sous l'influence des acides, le ton franc, caractéristique du phénomène naturel. C'est que ce phénomène nécessite le développement concomitant de deux organismes: le b. cyanogène (qui fournit le colorant gris) et le b. lactique (qui, grâce à l'acide formé, fait virer ce colorant au bleu). *M. Gessard a réalisé l'aspect typique,* en cultivant le microbe du lait bleu dans le lait additionné de glucose et d'un lactate. L'acide lactique du lactate met en train la production du bleu; l'acide lactique, provenant de la fermentation du glucose (le b. du lait bleu fermente le glucose, mais non le lactose), maintient ensuite la teinte invariable. De même que pour le bacille pyocyanique, il est possible d'obtenir plusieurs *races du bacille cyanogène* (Gessard). La race normale donne, dans le lait, le pigment gris; dans le bouillon, cette couleur, associée au pigment

vert fluorescent; et, dans l'albumine d'œuf, le seul colorant fluorescent. Par cultures successives en albumine, on crée une variété qui, reportée dans le bouillon n'y sécrète que le pigment gris. En chauffant la race normale, on obtient un type purement fluorescigène (quand il est ensemencé en bouillon). Enfin, en chauffant ce type fluorescigène, on aboutit à une variété incolore.

Laits rouges.

La coloration rouge, que peut prendre accidentellement le lait, est due le plus souvent au *b. prodigiosus*, ailleurs à une *sarcine rouge* (peu étudiée), au *coccus de Keferstein* ou au *b. lactis erythrogenes* de Grotenfelt. Le microbe de Keferstein représente un petit coccus, décoloré par le Gram et dénué de tout pouvoir pathogène, pour les animaux comme pour l'homme. Il ne liquéfie pas la gélatine. Son optimum thermique est de 22°. Ensemencé dans le lait, il reproduit le phénomène du lait rouge. — Le bacillus lactis erythrogenes est immobile et ne forme pas de spores. Il donne, en gélatine, des colonies rondes et jaunâtres; la zone voisine du milieu se teinte en rose. Sur pomme de terre et sur gélose, on observe un dépôt jaune, tout autour duquel se manifeste une coloration rougeâtre. Le lait est coagulé et peptonisé; il prend un ton rouge sale, qui devient plus tard rouge sang.

Lait noir. Lait jaune.

Il nous suffira de mentionner le phénomène du lait noir, dû à l'action du *bacillus lactis niger* de Gorini et celui du lait jaune, produit par le *bacillus synxanthus* d'Ehrenberg.

Microbes zymogènes.

1° *Fermentation lactique.*

Les organismes, capables de produire la fermentation lactique, sont très nombreux. Nous ne parlerons, bien entendu, que de ceux qu'on rencontre *souvent* dans le lait et chez lesquels la production d'acide lactique constitue l'*acte physiologique dominant.*

Bacillus lactis aerogenes.

Il représenterait, pour beaucoup d'auteurs, l'agent le plus fréquent de la coagulation « spontanée » du lait. Il a été trouvé par M. Escherich dans le tube digestif des nourrissons, puis dans les fèces de l'adulte. Divers observateurs l'ont ensuite rencontré dans l'infection urinaire. Le bacillus lactis aerogenes se montre très voisin du b. de Friedländer, avec lequel M. Grimbert n'hésite pas, avons-nous dit, à l'identifier. Il est immobile, pléomorphe et ne forme pas de spores. Il ne prend pas le Gram. Ensemencé en bouillon, il donne lieu à un anneau superficiel. Il offre l'aspect en tête de clou dans la gélatine (celle-ci n'est pas liquéfiée). Il forme sur gélose et sur pomme de terre un dépôt très épais. Sur pomme de terre, la présence de gaz est fréquente. Il coagule rapidement le lait et fait fermenter de nombreux sucres. Enfin, expérimentalement, il se comporte comme un pneumobacille peu virulent.

Bacille lactique de Pasteur et Hüppe.

C'est un bâtonnet court et immobile, décoloré par la méthode de Gram. Il représente un ferment lactique très énergique. Les colonies en gélatine rappellent celles du b. coli. Sur gélose, on observe un dépôt

blanc, épais et sur pomme de terre une couche brunâtre, très épaisse également (et très analogue à celle du b. coli).

Bacillus lacticus de Günther et Thierfelder.

Il est immobile et donne, sur gélatine, des colonies blanchâtres, très petites. Il pousse très médiocrement sur pomme de terre.

2° *Fermentation butyrique.*

Le nombre des ferments butyriques est illimité, comme celui des ferments lactiques. Nous décrirons seulement les suivants.

Bacillus butyricus de Botkin.

Bâtonnet anaérobie, mobile et sporulé, dont la *présence* est *constante dans le lait du commerce.* Il produit, en bouillon, un trouble très marqué et, en gélose, des colonies rameuses. En gélatine, on n'observe aucune ramification et le milieu est liquéfié très rapidement. Dans la gélatine, comme dans la gélose, le dégagement de gaz se montre très précoce. La pomme de terre est attaquée, avec formation d'alcool. Le bacille de Botkin coagule le lait en 18 heures ; il y a production d'acide butyrique, de CO^2 et d'H ; le liquide est ensuite peptonisé. Ni la cellulose, ni les lactates ne sont décomposés. Enfin, le microbe ne présente pas de propriétés pathogènes. Il suffit, *pour l'isoler,* de remplir un flacon de lait, de chauffer une demi-heure à 100°, de boucher et de mettre à l'étuve.

Clostridium butyricum des auteurs.

Le clostridium butyricum a été décrit surtout par Pasteur, van Tieghem et Praszmowski. Ses spores sont moins résistantes que celles du bacille précédent. Le

clostridium de Pasteur attaque les lactates, celui de van Tieghem la cellulose. Ces deux organismes paraissent cependant identiques entre eux et avec le microbe de Praszmowski. Tous les trois sont des anaérobies stricts. Leur étude mériterait d'être reprise plus complètement.

Bacille anaérobie II de Flügge.

C'est un bâtonnet sporulé, qui *se rencontre fréquemment dans le lait* bouilli pendant une heure et demie. Il liquéfie la gélatine et donne, en gélose, des colonies d'un brun jaune, peu rameuses. Il coagule le lait et dégage des gaz abondants. Les cultures manifestent une odeur rance très marquée.

Bacille anaérobie IV de Flügge.

C'est encore un bacille sporulé que l'on rencontre *couramment dans le lait* bouilli pendant une heure et demie. Il liquéfie la gélatine et coagule le lait en fins flocons. Les cultures dégagent une odeur butyrique et putride assez prononcée. Filtrées, elles se montrent toxiques (par ingestion et inoculation sous-cutanée).

3° *Fermentation visqueuse.*

Elle est occasionnée, tantôt par des bacilles du *groupe subtilis,* tantôt par des bacilles du *groupe aerogenes.* Comme type des premiers, on peut citer le *b. Hessii* de Guillebeau. C'est un bâtonnet mobile, sporulé, qui liquéfie la gélatine et donne une couche jaunâtre, puis brune sur pomme de terre. Ensemencé dans le lait, à la température ordinaire, il le rend visqueux. La matière visqueuse est ensuite dissoute en 2 ou 3 jours, quand on porte la culture à 35°. — Parmi les bacilles du groupe aerogenes, nous citerons le

b. viscosus lactis d'Adametz (qui ne dégage aucune odeur et n'acidifie pas) et le *b. lactis pituitosi* de Löffler (qui dégage une odeur spéciale et acidifie un peu).

4° *Fermentation du képhir.*

Elle représente une fermentation mixte, lactique et alcoolique. Au Caucase, on met le lait (de vache ou de chèvre) dans une outre; on ajoute quelques *grains* frais (résidu d'une fermentation antérieure); on ferme et on place à une température moyenne, en agitant de temps en temps. Après un ou deux jours, la boisson est prête. Dans nos pays, on peut recourir à l'une des deux méthodes suivantes. 1° On se sert des grains du commerce, qui offrent une couleur brune et se conservent pendant très longtemps. On les met, pendant 5 à 6 heures, dans de l'eau tiède, pour les faire gonfler. Puis, on les lave et on les place dans du lait frais. On renouvelle celui-ci une à deux fois par jour, jusqu'à ce que les grains deviennent blancs et montent en 20 à 30 minutes à la surface du liquide. Chaque litre de lait reçoit alors une cuillerée à soupe de grains. Après 5 à 8 heures, on ferme le récipient qui contient le lait ensemencé, on porte à 18° et on agite toutes les 2 heures. Après 8 à 24 heures, on transvase, à travers un tamis, dans un autre flacon, en ne remplissant celui-ci qu'aux 4/5. On ferme et on agite de temps en temps. Après un jour, on obtient une boisson encore pauvre en alcool et en CO^2. Le jour suivant, le liquide est devenu très acide. On préfère en général ce képhir de deux jours. — 2° On prend une partie de képhir du deuxième ou du troisième jour et 3 à 4 parties de lait. On opère dans des flacons bouchés et on laisse fermenter 48 heures, en agitant de temps en temps,

Ce procédé suppose naturellement une fabrication continue.

Le *koumys,* très voisin du képhir, est obtenu par fermentation du lait de jument.

Microbes pathogènes.

Parmi les pathogènes qu'on peut rencontrer dans le lait, il nous suffira de rappeler le *streptocoque de la mammite contagieuse,* le *microcoque de l'araignée* et le *virus aphteux,* étudiés antérieurement.

Une mention spéciale est due au *bacillus enteritidis sporogenes* de Klein, *qui occasionne* assez fréquemment *des diarrhées* à Londres. Ces diarrhées se manifestent, le plus souvent, *sous forme épidémique.* Bien qu'elles puissent s'accompagner de phénomènes de collapsus alarmants, on n'a jamais signalé de cas mortels. Le b. enteritidis sporogenes se rencontre couramment (à Londres) dans le lait du commerce, ce qui explique la diffusion des accidents qu'il détermine. C'est un anaérobie, sporulé et mobile. Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline et prend le Gram. Ses cultures dégagent une odeur butyrique et produisent beaucoup de gaz. Il coagule le lait. Enfin, il se montre pathogène pour la souris et pour le cobaye. Inoculé sous la peau, il tue ce dernier animal avec des lésions qui rappellent beaucoup celles que provoque le vibrion septique.

Le lait intéresse, avant tout, le bactériologue en raison des *bacilles tuberculeux* qu'il peut recéler. M. Obermüller les a trouvés dans 7 pour 100 des échantillons, M. Fiorentini dans 10 pour 100, M. Bang dans 15 pour 100, M. Bollinger dans 16 pour 100, M. Bunge dans 22 pour 100, M. Martin et M. Ernst dans 33 pour 100 et le Laboratoire Municipal de Paris dans 40 pour 100. Nous devons toutefois faire remarquer que ces recherches sont antérieures aux travaux

dans lesquels M. Petri a démontré que le beurre et le lait renfermaient fréquemment des *pseudobacilles tuberculeux*. Ces organismes seront étudiés à propos de l'analyse bactériologique du beurre, où ils ont été signalés tout d'abord. Beaucoup des chiffres que nous venons de citer doivent donc être considérés comme au-dessus de la réalité. De fait, M. Petri, examinant 64 échantillons de lait, ne rencontra le bacille tuberculeux que dans 14 pour 100 des cas; dans 6,3 pour 100, il s'agissait du pseudobacille.

On s'est demandé si le lait de vaches, atteintes simplement de tuberculose pulmonaire, pouvait contenir des bacilles; en d'autres termes, *si le lait n'était dangereux qu'en cas de tuberculose des glandes mammaires.* Cette question paraît résolue depuis les recherches de M. Kempner et de Mlle Rabinowitch. Examinant, à ce point de vue, 15 vaches qui avaient réagi à la tuberculine, ils trouvèrent que le lait de 10 d'entre elles était infectieux. Or, un seul animal, parmi ces 10, présentait de la tuberculose (clinique) de la mamelle.

Ajoutons que le b. tuberculeux pourrait vivre jusqu'à 10 jours dans le lait caillé (Heim) et jusqu'à 16 jours dans le petit lait (Galtier).

Pour mettre en évidence le b. de Koch, on inocule ordinairement de 5 à 10 centimètres cubes de lait dans le péritoine du cobaye. Mieux vaut laisser sédimenter une certaine quantité de liquide et inoculer, à plusieurs animaux, des prises de la surface et du dépôt. En usant du centrifuge, on opérera plus rapidement et plus sûrement encore.

La *stérilisation du lait,* au point de vue du bacille tuberculeux, offre une grande importance. M. Th. Smith a montré que si, dans le bouillon, l'eau physiologique, etc., le b. de Koch était tué en 15 à 20 minutes à 60°, il pouvait, dans le lait, résister à 65°,

protégé qu'il est par les globules gras. Aussi conseille-t-il d'atteindre 68° et de plonger complètement, dans le bain-marie, des flacons pleins et bien bouchés. De son côté, M. Morgenroth recommande de chauffer 3 heures à 55°, 30 minutes à 70°, ou encore 3 à 5 minutes à 100°.

Microbes peptonisants et toxigènes.

Le lait peut être peptonisé par un grand nombre de microbes et notamment de bacilles. Parmi ces microbes, beaucoup rendent le liquide *amer* et y sécrètent des *poisons* qui, ingérés par les jeunes chiens, produisent chez eux de la diarrhée, de la parésie musculaire et de l'hypothermie. Ces poisons peuvent tuer également divers animaux par inoculation sous-cutanée. Il est donc juste de leur attribuer un certain *rôle dans les diarrhées infantiles*. L'étude des bacilles peptonisants a été faite très complètement par M. Flügge. Les bactéries peptonisantes ne sont pas forcément toxigènes. Inversement, les bactéries toxigènes ne sont pas forcément peptonisantes ; ainsi, l'anaérobie IV de Flügge, qui représente un ferment butyrique, sécrète, ainsi que nous l'avons vu, un poison très actif. Les microbes peptonisants appartiennent au *groupe du subtilis*. Tout d'abord le lait, dans lequel ils se développent, ne semble pas modifié en apparence ; à peine voit-on, sous la crème, une zone peu étendue, où le liquide est devenu plus transparent (début de peptonisation). Pourtant, beaucoup de ces microbes sécrètent de la présure, mais celle-ci n'est pas assez abondante pour coaguler rapidement le lait à la température ordinaire (il se caille par contre très souvent quand on vient à le chauffer). Dans les conditions habituelles, il y a donc peptonisation, avant toute trace de coagulation. Les bacilles peptonisants sont munis de spores très résistantes. On les rencontre *dans presque tous*

55.

les laits du commerce. Une manipulation soigneuse les éliminerait facilement. Parmi ces microbes, nous citerons :

1° *Le b. pseudo-butyrique de Hüppe.* Il ne produit de l'acide butyrique que si le lait a été fermenté lactiquement par d'autres germes. Il liquéfie la gélatine, donne un dépôt blanc bleuté sur gélose et une couche brune sur pomme de terre.

2° *Les bacilles de Flügge,* au nombre de 12 et désignés par les chiffres correspondants. Ce sont des microbes mobiles. Les n^os I, III et VII se montrent très toxigènes.

II. *Étude bactériologique du beurre.*

L'analyse bactériologique du beurre se réduit pratiquement à la *recherche du bacille tuberculeux.* Ce bacille a été trouvé dans un échantillon sur 10 par M. Brusaferro, dans 2 sur 20 par M. Roth, dans 8 sur 17 par M. Gröning, dans 9 sur 20 par M. Morgenroth et dans 14 sur 14 par M. Obermüller. Tous ces travaux sont antérieurs aux études de M. Petri et il peut se faire que des *pseudobacilles tuberculeux* aient été pris, plus ou moins souvent, pour le bacille de Koch. Sur 102 échantillons examinés, M. Petri a rencontré 33 fois le bacille tuberculeux et 54 fois le pseudobacille ; 16 fois les deux organismes coexistaient. Nous citerons encore les chiffres suivants :

	NOMBRE D'ÉCH. EXAMINÉS	BACILLE DE KOCH	PSEUDOBACILLE TUBERCULEUX
Hormann et Morgenroth. .	10	3	1
Korn.	20	4	4
Tobler.	12	2	5

Pour rechercher le bacille de Koch dans le beurre, on en fera fondre 100 à 500 centimètres cubes à 37°. On laissera reposer quelque temps, puis on injectera,

dans le péritoine des cobayes, 4 à 5 centimètres cubes, pris à la surface et autant, au niveau du sédiment. On peut aussi agiter 5 grammes de beurre fondu avec de l'eau chaude, centrifuger et inoculer le dépôt. Si les animaux ne sont pas morts après 4 à 6 semaines, on les sacrifie.

A l'autopsie, la *pseudo-tuberculose* se distingue de la tuberculose vraie, en ce que les granulations se montrent surtout superficielles sur les viscères abdominaux et exclusivement superficielles sur les poumons. La rate n'est pas hypertrophiée et ne présente pas, à la coupe, l'aspect marbré bien connu. Il est facile d'isoler des lésions des *bacilles qui diffèrent, suivant les cas, mais appartiennent le plus souvent au type Petri*. Voici les caractères essentiels de ce dernier. Organismes plus volumineux que le b. de Koch, mais résistant comme lui aux acides et à l'alcool, quand on les examine en culture. Développement rapide et abondant dans les divers milieux. Sur gélose, après 2 à 3 jours (37°), on observe une couche jaunâtre et épaisse. Les bacilles ne tuent pas le cobaye, le lapin et la souris dans le péritoine. Si on les mélange avec du beurre, ils déterminent une inflammation locale exsudative. En faisant des passages, on parvient à obtenir des lésions pseudo-tuberculeuses, sans addition de beurre. L'injection dans les veines du lapin engendre une éruption viscérale miliaire, à tendance suppurative. Les granulomes ainsi produits contiennent des cellules géantes et sont riches en bacilles, mais ceux-ci ont perdu *in vivo* la résistance à l'alcool et aux acides (Hölscher).

Dans le beurre infecté artificiellement, M. Heim a vu le b. tuberculeux rester vivant pendant 30 jours, M. Gasperini pendant 102 jours.

Ajoutons, pour terminer, que la *présence du b. de Koch* a été signalée *dans la margarine* par M. Mor-

genroth. Le bacille proviendrait, soit du lait de basse qualité employé dans la fabrication, soit des ganglions lymphatiques des animaux dont on manipule la graisse. Pour rechercher le b. de Koch, on portera la margarine à 42°-50° pendant 2 heures; on centrifugera et on inoculera des cobayes avec le dépôt, soit sous la peau, soit, de préférence, dans le péritoine. M. Morgenroth a obtenu, en effet, un résultat positif sur 10 dans le premier cas et 8 sur 10 dans le second.

III. *Étude bactériologique des fromages.*

Microbes pathogènes.

On trouve, dans les fromages, des organismes fort variés (moisissures, levures, bactéries). Parmi les *bactéries,* il en est rarement de pathogènes. On connaît cependant les *empoisonnements par les fromages* et on sait qu'ils se présentent *parfois* sous forme de *petites épidémies*. M. Metchnikoff a fait ressortir, d'une part, la fréquence des vibrions dans les fromages (vibrion de Deneke, vibrions des fromages de Brie, etc.) et, d'autre part, l'analogie qui existe entre les signes des empoisonnements auxquels ils peuvent donner naissance et ceux du choléra. Il se demande, en conséquence, si, dans certains cas tout au moins, les intoxications observées ne seraient pas d'origine vibrionnienne.

Le *bacille de Koch* se rencontre rarement dans les fromages. Il faut en excepter cependant la variété connue sous le nom de « fromage à la crème », où de nombreux auteurs ont signalé sa présence. Tout récemment encore, M. Harrisson l'isolait de 3 échantillons sur 6. Divers bactériologues ont infecté artificiellement le lait destiné à la préparation des fromages, puis ils ont recherché quelle pouvait être, dans ces

conditions, la vitalité du b. tuberculeux. Les chiffres obtenus concordent assez mal. La question a été, tout récemment, reprise par M. Harrisson. Du lait, copieusement additionné de bacilles, servit à faire, d'une part, du fromage de Cheddar, de l'autre, du fromage de Gruyère. Les inoculations, pratiquées à intervalles variés, ont montré que, dans le Gruyère, la mort des bacilles survenait au bout de 40 jours, tandis que, dans le Cheddar, il existait encore, au bout de 104 jours, des germes virulents. Il importe toutefois de faire remarquer que les deux fromages en question ne sont jamais consommées moins de quatre mois après leur fabrication. A ce moment, même dans le Cheddar, tous les b. de Koch ont certainement péri.

Microbes zymogènes.

Chacun connaît le *rôle des microbes dans la maturation*, mais on discute encore à cet égard sur l'importance respective des diverses bactéries qu'on peut isoler des fromages. Pour M. Freudenreich, ce sont les bacilles lactiques qui prendraient la plus grande part à la transformation de la caséine. Cette opinion a été contestée par M. Duclaux ; d'après lui, le rôle essentiel revient aux divers peptonisants qu'il a décrits sous le nom générique de tyrothrix. La formation des « yeux » est également d'origine microbienne. Elle reconnaît pour cause un dégagement gazeux, caractéristique d'une fermentation. On a beaucoup discuté sur les espèces qui produisent celle-ci. La majorité des auteurs invoque l'action des bactéries lactiques. Nous nous contenterons de rappeler simplement ici le nom des principales *bactéries* isolées des fromages.

1° *Espèces coagulantes et peptonisantes* (tyrothrix de M. Duclaux). Les unes sont strictement aérobies et appartiennent au groupe du subtilis (t. tenuis, t. dis-

tortus, t. geniculatus, t. turgidus et t. scaber). D'autres, comme le t. urocephalus, sont facultativement anaérobies. D'autres enfin, strictement anaérobies (t. claviformis).

2° *Espèces coagulantes et peptonisantes, susceptibles de déterminer la fermentation lactique.* Ce sont des bacilles aérobies, sporulés, immobiles. Tous liquéfient la gélatine. Décrites par M. Adametz, ces espèces semblent former un groupe assez naturel.

3° *Ferments lactiques.* De nombreux bacilles lactiques ont été rencontrés dans les fromages par MM. Adametz, Henrici et de Freudenreich. A ces bacilles nous devons ajouter ceux que l'on isole couramment du lait (b. de Pasteur et Hüppe, b. aerogenes, etc. — *ubi supra*).

4° *Ferments butyriques.* A côté des ferments butyriques du lait, déjà décrits, nous devons citer quelques espèces observées exclusivement dans les fromages : le b. acidi butyrici, de M. Kedrowski (aérobie), les tyrothrix virgula et filiformis, de M. Duclaux (aérobies) et le tyrothrix catenula, du même auteur (anaérobie facultatif).

Il nous suffira de mentionner, en terminant, les *maladies des fromages,* souvent dues à des espèces chromogènes. Elles offrent un caractère trop spécial pour pouvoir trouver place ici.

FORMULAIRE

Nous réunirons ici quelques formules de solutions nutritives et colorantes, employées par divers auteurs. Bien que ces solutions ne soient pas, pour la plupart, d'un usage courant, il est bon de savoir les préparer au besoin.

I. — Milieux de culture

Liquide Pasteur n° 1.

Eau.	100	grammes.
Tartrate d'ammoniaque.	1	—
Cendres de levure.	1	—
Sucre candi.	10	—

(Études sur la fermentation alcoolique.)

Liquide Pasteur n° 2.

Eau..	2 500	grammes.
Tartrate de chaux (droit).	1	—
Phosphate d'ammoniaque.	1	—
Phosphate de magnésie..	1	—
Phosphate de potasse.	$0^{gr},5$	
Sulfate d'ammoniaque.	$0^{gr},5$	

(Études sur la fermentation du tartrate de chaux.)

Liquide Pasteur n° 3.

Eau..	9 000 à 10 000	grammes.
Lactate de chaux..	225	—
Phosphate d'ammoniaque.	$0^{gr},75$	
Phosphate de potasse.	$0^{gr},4$	
Sulfate d'ammoniaque.	$0^{gr},4$	
Sulfate de magnésie.	$0^{gr},2$	

(Études sur la fermentation butyrique.)

Liquide Pasteur n° 4.

Eau.	3 000 à 4 000 grammes.
Sucre candi.	200 —
Bitartrate de potasse.	1 —
Bitartrate d'ammoniaque. . . .	0gr,5
Sulfate d'ammoniaque.	1gr,5
Cendres de levure..	1gr,5

(Études sur la fermentation alcoolique.)

Liquide Jaksch.

Eau..	1 000 grammes.
Sulfate de magnésie..	0gr,06
Phosphate acide de potasse.	0gr,12
Sel de Seignette	5 grammes.
Urée.	5 —

(Études sur la fermentation ammoniacale.)

Liquide Mayer.

Eau.	100 grammes.
Phosphate de potasse..	0gr,5
Sulfate de magnésie.	0gr,25
Phosphate de chaux.	0gr,05
Sucre candi.	15 grammes.
Nitrate d'ammoniaque.	0gr,75

(Études sur la fermentation alcoolique.)

Liquides pour la fermentation acétique.

Vin.	1 partie.	Bière.	1 partie.
Vinaigre. . . .	1 —	Vinaigre. . . .	1 —
Eau.	2 —	Eau.	1 —

Liquide Cohn.

Eau.	100 grammes.
Phosphate de potasse..	0gr,50
Sulfate de magnésie.	0gr,05
Phosphate tricalcique.	0gr,05
Ajouter, après dissolution :	
Tartrate d'ammoniaque.	1 gramme.

(Culture du b. termo.)

Liquide Péré n° 1.

Eau	100 grammes.
Lactate ou succinate d'ammoniaque	20 —
Phosphate de potasse	$2^{gr},5$
Phosphate de soude	$2^{gr},5$
Sulfate de magnésie	$1^{gr},5$
Chlorure de sodium	$1^{gr},25$

(Culture du b. coli et du b. typhique.)

Liquide Péré n° 2.

Eau	100 grammes.
Lactate ou succinate d'ammoniaque	20 —
Phosphate double de soude et d'ammoniaque	5 —
Sulfate d'ammoniaque	2 —
Phosphate neutre de potasse	1 —
Sulfate de magnésie	1 —
Chlorure de sodium	1 —

(Culture du b. coli et du b. typhique.)

Liquide Maassen.

Neutraliser 100^{cc} d'acide malique à 7 p. 100 avec KOH à 7 p. 100.
Compléter à un litre et ajouter :

Asparagine	10 grammes.
Sulfate de magnésie	$0^{gr},4$
Phosphate bisodique	2 grammes.
Carbonate de soude	$2^{gr},5$

Et après dissolution :

Chlorure de calcium	$0^{gr},01$

(Culture des vibrions phosphorescents.)

Liquide Uschinsky.

Eau	1 000 grammes.
Glycérine	30 à 40 —
Chlorure de sodium	5 à 7 —
Chlorure de calcium	$0^{gr},1$
Sulfate de magnésie	$0^{gr},2$ à $0^{gr},4$
Phosphate bipotassique	2 à $2^{gr},5$
Lactate d'ammoniaque	6 à 7 grammes.
Aspartate de potasse	3 à 4 —

(Études sur la formation de la toxine diphtérique.)

Liquide Gosio.

Eau	800 grammes.
Glycérine	1gr,5
Chlorure de sodium	2gr,5
Phosphate bipotassique	1 gramme.
Acide aspartique	1gr,5
Carbonate de soude	2gr,5
Glucose	50 grammes.
Carbonate de chaux	20 —

(Culture des vibrions.)

Liquides Proskauer et Beck, pour l'étude du bacille tuberculeux.

Eau	100 grammes.
Asparagine	0gr,5
Acide citrique	0gr,075
Glucose	1 gramme.
Glycérine	4 —
Phosphate de potasse	0gr,5
Sulfate de magnésie	0gr,25
Chlorure de sodium	0gr,15
Sulfate de potasse	0gr,25

Eau	100 grammes.
Glucose	1 —
Sel ammoniac	0gr,1
Glycérine	4 grammes.
Chlorure de sodium	0gr,5

Eau	100 grammes
Carbonate d'ammoniaque	0gr,35
Phosphate monopotassique	0gr,15
Sulfate de magnésie	0gr,25
Glycérine	1gr,5

Liquide Scheurlen.

Eau	100 grammes.
Sucre	2 —
Asparagine	2 —
Phosphate bipotassique	0gr,1
Sulfate de magnésie	0gr,02
Chlorure de calcium	0gr,02

(Culture du b. prodigiosus.)

Liquide Cathelineau.

Eau.	1000	grammes.
Sucre.	20	—
Phosphate de soude.	5	—
Sel de Seignette.	5	—
Sulfate d'ammoniaque.	5	—
Peptone.	10	—
Carbonate de chaux.	*q. s.*	

(Culture du b. de la diarrhée verte.)

Liquide Gessard.

Eau.	1000	grammes.
Succinate d'ammoniaque..	10	—
Sulfate de magnésie.	2gr,5	
Phosphate de potasse..	5	grammes.

(Culture du b. pyocyanique.)

Liquides de Capaldi et Proskauer.

No 1. . .

Eau..	100	grammes.
Asparagine.	0gr,2	
Mannite.	0gr,2	
Chlorure de sodium..	0gr,02	
Sulfate de magnésie.	0gr,01	
Chlorure de calcium.	0gr,02	
Phosphate monopotassique.. .	0gr,02	

Neutraliser à la soude, jusqu'à ce que le tournesol prenne une teinte rouge violet.

(Diagnostic différentiel entre le b. coli et le b. typhique.)

No 2. . .

Eau..	100	grammes.
Peptone Witte.	2	—
Mannite.	0gr,1	

Neutraliser à l'acide citrique, jusqu'à ce que le tournesol prenne une teinte rouge violet.

(Diagnostic différentiel entre le b. coli et le b. typhique.)

II. — Solutions colorantes

Bleu de Koch.

Solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène..	1 cent. cube.
Eau distillée..	2 —
Potasse caustique à 10 pour 100. . . .	0,2

(S'altère rapidement.)

Bleu de Lœffler.

Solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène.	30 cent. cubes.
Potasse à 1 pour 10000.	100 —

(S'altère rapidement.)

Solutions de Weigert-Koch.

Eau d'aniline.	100 cent. cubes.
Solution alcoolique concentrée de fuchsine ou de violet.	11 —
Alcool absolu.	10 —

Violet de Weigert.

Ammoniaque liquide.	0cc,5
Alcool absolu.	10 cent. cubes.
Eau distillée..	90 —
Violet de gentiane.	2 —

Bleu de Sahli.

Solution aqueuse de borax à 5 pour 100. .	16 cent. cubes.
Solution aqueuse de bleu de méthylène. .	24 —
Eau distillée..	40 —

Bleu de Kühne.

Bleu de méthylène.	1gr,5
Alcool absolu.	10 cent. cubes.
Acide phénique à 5 pour 100.	100 —

Fuchsine de Lubimoff.

Fuchsine rubine.	0gr,5
Acide borique.	0gr,5
Alcool absolu.	15 cent. cubes.
Eau distillée..	20 —

Krystallviolet de Kühne.

Krystallviolet.	1 gramme.
Eau distillée..	90 cent. cubes.
Alcool absolu.	10 —
Sol. à 1 p. 100 de carbonate d'ammoniaque.	100 —

Bleu composé de Roux et Yersin.

Violet dahlia.	1 gramme.
Vert de méthyle.	4 —
Alcool absolu.	20 cent. cubes.
Eau distillée..	400 —

Fuchsine de Ziehl-Neelsen.

Fuchsine..	1 gramme.
Alcool absolu.	10 cent. cubes.
Eau phéniquée à 5 pour 100.	100 —

Bleu nitrique de Fränkel.

Alcool absolu.	50 cent. cubes.
Eau distillée..	30 —
Acide nitrique.	20 —
Bleu de méthylène..	à saturation.

(Pour décolorer et recolorer en une seule opération, lors de la recherche du b. tuberculeux.)

Vert acétique de Frænkel.

Alcool absolu.	50 cent. cubes.
Eau distillée..	20 —
Acide acétique.	30 —
Vert malachite.	à saturation.

(Mêmes usages que le bleu nitrique.)

Mélange de Gibbs.

Chlorhydrate de rosaniline.	2 grammes.
Bleu de méthylène.	1 —

Broyer et ajouter, peu à peu, jusqu'à dissolution complète :

Aniline.	3 cent. cubes.
Alcool rectifié.	15 —
Eau distillée..	15 —

(Pour colorer d'un seul coup, le b. tuberculeux en rouge, et les autres organismes, ainsi que le fond, en bleu. — Résultats très incertains).

Eau d'aniline.

Aniline.	5 cent. cubes.
Eau distillée..	100 —

Agiter fortement, puis passer sur un filtre mouillé.

ADDENDA

Saccharomyces guttulatus (addendum aux maladies des animaux de laboratoire).

Le saccharomyces guttulatus (Remak) ou cryptococcus guttulatus (Robin) est constant dans l'estomac et l'intestin du *lapin*, à partir du moment où il est sevré. L'intestin du *cobaye*, atteint de *gastro-entérite épidémique*, en est littéralement farci. Cependant, on n'a jamais pu reproduire l'affection, par ingestion du contenu intestinal. Le S. guttulatus ressemble à l'oïdium lactis. Toutefois, ses cellules sont arrondies, tandis que celles de l'oïdium se montrent légèrement carrées. Dans l'intestin du lapin, il se présente sous forme de longs chapelets d'éléments soudés bout à bout, avec ramifications latérales. En ensemençant, dans des milieux contenant 10 pour 100 de glucose et 5,8 pour 100 d'HCl, le contenu intestinal d'un cobaye atteint de gastro-entérite, et en portant à l'étuve à 39°, on obtient le plus souvent d'emblée une culture pure du saccharomyces. En partant de ces cultures, MM. Casagrandi et Buscalioni ont réussi à faire pousser le parasite sur la gélose sucrée et acide, où il forme des ascospores. L'injection du microbe, sous la peau ou dans le péritoine du cobaye, de la souris et du lapin, provoque l'apparition de nodules, qui suppurent ensuite. La mort peut arriver du 15ᵉ au 30ᵉ jour chez le lapin, du 10ᵉ au 20ᵉ chez le cobaye, du 10ᵉ au 15ᵉ chez la souris. L'inoculation dans les veines du lapin détermine la mort en 6 à 8 jours.

Culture des amibes.

Les amibes sont très répandues dans le sol, les eaux, les déjections, etc. Certaines espèces ont pu être cultivées par divers auteurs. Parmi les milieux conseillés à cet effet, nous citerons : la gélose, dépouillée de toute matière organique (par lavages répétés à l'eau distillée), puis additionnée de phosphate ammonio-sodique (0,5 pour 100), de chlorure de potassium (0,5 pour 100) et d'un peu de carbonate de chaux, fraîchement précipité [Beyerinck] — la gelée de fucus, à 5 pour 100 (dans l'eau ou le bouillon), fortement alcalinisée afin d'éviter, le mieux possible, le développement des bactéries [Celli et Fiocca] — la gélose à l'infusion de paille ou de foin [Schardinger] — la pomme de terre, alcalinisée ou non [Celli et Fiocca, Gorini], etc. D'après MM. Casagrandi et Barbagallo, on ne réussirait qu'avec les espèces vraiment saprophytiques ; les amibes parasitaires, ou simplement commensales (a coli), ne se développeraient pas. D'autre part, il semble incontestable que les amibes exigent, comme aliments uniques, des bactéries *vivantes*.

M. Frosch a pu faire végéter une amibe du sol sur les cultures d'un bacille particulier. Il a constaté que les rhizopodes se nourrissaient de microbes vivants et que les cultures filtrées, ou même les microbes morts, ne suffisaient pas à l'alimentation. Pour isoler cette amibe, il s'est adressé aux formes kystiques, vieilles d'au moins deux semaines et plus résistantes que les cellules adultes et même que les kystes jeunes. Il les a débarrassées des autres germes, en faisant agir une solution alcaline assez forte, pendant 3 jours.

M. Mouton a cultivé, de son côté, sur gélose, une amibe de la terre de jardin, en la nourrissant de colibacilles.

Addendum à la coloration des cils.

Dans la méthode de Löffler modifiée, *M. Borrel recommande* de faire agir d'abord l'encre de fuchsine *à froid*, pendant deux ou trois minutes, en agitant constamment la lame. Puis, on lave et, sans enlever l'excès d'eau qui reste sur le porte-objet, on dépose à nouveau l'encre de fuchsine qui, cette fois, sera chauffée. En opérant ainsi, on dilue le « mordant » et on l'empêche de se dessécher sur la préparation, ce qui engendrerait des précipités. On pratique ensuite, comme nous l'avons dit, deux ou trois chauffages, en prenant soin de laver dans l'intervalle et de laisser un excès d'eau.

Pour ne pas avoir de précipités, M. Borrel recommande encore d'éviter que l'encre de fuchsine ne vienne au contact des doigts ou de la pince, qui tiennent le porte-objet ; on ne « mordancera » donc que la moitié environ de la lame. Il recommande, enfin, un *lavage à fond* avant la coloration, afin d'enlever toute trace d'encre de Löffler non fixée sur les bactéries. *(Communication orale.)*

Recherches des hématozoaires dans les coupes.

L'un de nous a obtenu d'excellents résultats avec la méthode suivante. Les viscères sont fixés par le sublimé aqueux saturé. On teinte les coupes, à l'aide du bleu de méthylène phéniqué (solution de bleu à 1 pour 100, dans l'eau phéniquée à 1 pour 100), pendant une demi-minute ; on passe, durant une quinzaine de secondes, dans le chromate jaune de

potasse (solution aqueuse à 1 pour 100); puis, on monte au baume, après lavage, déshydratation et éclaircissement.

Méthode de Borrel, pour l'étude des structures cellulaires *(cette méthode convient, mieux que toute autre, pour l'étude des protozoaires dans les tissus).*

Fixer de petits fragments, pendant 24 heures et à la température la plus basse possible (à la glacière, s'il y a moyen), dans le mélange suivant :

Acide osmique.	2	grammes.
Chlorure de platine.	2	—
Acide chromique..	3	—
Acide acétique.	20	—
Eau distillée.	350	—

Laver à l'eau courante. Inclure dans la paraffine. Débiter en coupes minces. *Colorer* celles-ci, durant une heure à froid, par le rouge Magenta (solution aqueuse saturée). *Différencier*, pendant 5 à 10 minutes, à l'aide du picro-indigocarmin :

Solution aqueuse saturée d'acide picrique.. . . .	1 volume.
Solution aqueuse saturée de carmin d'indigo. . .	2 volumes.

Passer très rapidement dans l'eau. *Décolorer* par l'alcool absolu, puis par l'essence de girofle. Lorsque les coupes se montrent encore trop teintées, on les traite successivement par l'alcool absolu, l'eau et le picro-indigocarmin. Après que ce dernier a agi pendant 5 minutes, on traite une seconde fois, par l'eau (très rapidement), l'alcool absolu et l'essence de girofle. Un long séjour dans l'essence permet la mise en évidence des plus fins détails histologiques.

Dans les coupes, colorées par la méthode de Borrel, les noyaux (et la chromatine en général) sont teintés

en rouge brillant ; les protoplasmes prennent toutes les nuances intermédiaires entre le vert et le bleu ; enfin, l'hémoglobine apparaît en jaune ou en vert jaunâtre.

Variété mélanogène du bacille pyocyanique.

Découverte par M. Cassin et étudiée par M. Radais et M. Gessard. Elle donne, sur pomme de terre, une couche rouge marron, qui noircit ensuite et, dans les solutions de peptone, les teintes habituelles au b. pyocyanique normal, suivies d'une coloration brune, puis noire. Elle convertit le lait en un liquide semblable à de l'encre. M. Gessard a montré que la production du pigment, spécial à cette variété, se trouve subordonnée à la présence de la tyrosine dans les milieux de culture. En voici la preuve.

Si l'on ensemence, comparativement, le b. pyocyanique normal et le b. de Cassin dans la solution saline suivante,

Succinate d'ammoniaque.	1 gramme.
Biphosphate de K ou de Na..	1 —
Sulfate de magnésie.	2gr,5.
Chlorure de calcium cristallisé.. . . .	1gr,25.
Eau.	1 litre.

on n'observera aucune différence appréciable ; il se produira de la pyocyanine et du pigment vert fluorescent. Mais, si l'on ajoute au milieu 0,5 pour 1 000 de tyrosine, la culture du b. normal conservera ses caractères, tandis que la culture du b. de Cassin offrira rapidement une teinte rose, puis acajou, qui deviendra prédominante. Cette teinte se manifestera même seule, si on supprime le succinate d'ammoniaque. Elle est identique à celle que détermine, dans une solution de tyrosine, l'addition de la tyrosinase,

fournie par une macération de champignons. Dans ce dernier cas, toutefois, un précipité noirâtre succède à la coloration acajou ; l'absence de ce précipité, au sein de la solution saline indiquée, doit être attribuée à des substances empêchantes encore mal connues. Ces substances n'existent certainement point dans la solution de peptone, dans le lait et sur pomme de terre, puisque la teinte noire s'y manifeste régulièrement.

Concluons que la fonction mélanogène du b. de Cassin est en rapport avec la sécrétion de *tyrosinase*, diastase oxydante aujourd'hui bien connue. M. Gessard a démontré que le bacille pouvait former également de la tyrosine, par digestion des albuminoïdes.

Streptocolysine.

Hémolysine sécrétée par le streptocoque. Pour l'obtenir, « on commence par injecter à un lapin, sous la peau, plusieurs gouttes de streptocoque de 24 heures en bouillon-ascite ; le lendemain, dès que le lapin est mort, et après s'être assuré que le sang est dissous, on prélève avec une pipette, dans le cœur, 2-3 gouttes de sang, avec lequel on ensemence un tube contenant du sérum de lapin seul, ou un mélange de sérum de lapin et de sérum de mouton ou de chèvre. On porte à l'étuve pour 24 heures ; puis, après avoir étendu la culture de son volume d'eau physiologique, on filtre le mélange à travers la bougie Chamberland » (Besredka).

Cette hémolysine dissout les hématies de la plupart des animaux de laboratoire. L'optimum de son action se trouve à 37°. Elle n'est détruite que par un chauffage de 2 heures à 70°. Enfin, elle n'est pas toxique pour les animaux (mouton, lapin).

Substances bactéricides des sérums normaux *(ou cytases)*

M. Metchnikoff a montré que les sérums normaux renferment au moins deux espèces de cytases : la *macrocytase* et la *microcytase*.

La macrocytase, contenue *in vivo* dans les leucocytes mononucléaires (ou macrophages), se retrouve aussi dans les exsudats riches en mononucléaires, ainsi que dans les extraits des organes d'où ceux-ci tirent leur origine (rate, épiploon, ganglions lymphatiques). Elle agit très bien, comme les macrophages, sur les cellules animales (y compris les microbes animaux) et peu ou point sur les bactéries (à l'exception, toutefois, des agents de diverses maladies chroniques : b. tuberculeux, b. de la lèpre, actinomyces, etc.).

La microcytase, contenue *in vivo* dans les polynucléaires (ou microphages), se retrouve dans les exsudats riches en polynucléaires, ainsi que dans les extraits de la moelle osseuse, d'où ceux-ci tirent leur origine. Elle agit très bien, comme les microphages, sur la plupart des bactéries et peu ou point sur les cellules animales.

Addendum au chapitre « Morve ».

Nous devons réparer ici une omission importante (due à une modification du plan initial des « Applications médicales et vétérinaires »). Dans le chapitre « Morve », il n'a été parlé que des inoculations pratiquées sur le cheval morveux. Le *cheval neuf* se montre, naturellement, sensible au bacille spécifique. Lorsqu'on inocule celui-ci, par scarifications ou sous la peau, l'animal contracte, après 3-6 jours, un chancre type, suivi d'accidents subaigus ou chroniques. L'inoculation sur la pituitaire reproduit la

morve nasale. Enfin, M. Nocard a fait voir que l'ingestion de cultures, diluées dans l'eau de boisson, provoque l'apparition de tubercules pulmonaires translucides. Le développement de ces tubercules se traduit par une réaction constante à la malléine, après 15 jours au plus. Ultérieurement, certains sujets offrent des signes cliniques caractéristiques; les autres guérissent par transformation fibreuse ou calcaire des nodules morveux. Ces derniers animaux se montrent toujours parfaitement réinfectables par ingestion (Nocard).

Lors de l'infection naturelle, il est certain que la contamination se fait, dans l'immense majorité des cas, par les voies digestives. Les chevaux prennent la morve en buvant de l'eau souillée par les produits virulents qui émanent des sujets atteints..

Sérothérapie de la fièvre typhoïde.

M. Chantemesse a appliqué avec succès son sérum antityphique à la guérison des dothiénentériques. S'il s'agit de malades au premier septénaire de l'affection, on injecte 10-12 centimètres cubes et la guérison a lieu, en général, très rapidement ; la fièvre tombe, le pouls se ralentit, la diarrhée cesse, la polyurie s'établit. Quand, après 8-10 jours, l'apyrexie n'est pas complète, on fait une nouvelle injection, de 5-10 centimètres cubes, selon les cas. S'il s'agit de malades à un stade plus avancé, on se contente d'administrer 6-8 centimètres cubes, pour éviter une trop forte réaction fébrile, quitte à recommencer au bout de quelques jours; la température baisse en lysis et la convalescence s'établit peu à peu. Nous venons de dire que le sérum provoque une réaction fébrile; il est indiqué de réprimer celle-ci par les bains froids. On complètera le traitement en ordonnant des boissons abondantes.

M. Chantemesse conseille l'emploi systématique du sérum, dans tous les cas où l'on soupçonne un début de fièvre typhoïde.

Bacille du chancre mou et bacille de Pfeiffer.

M. Himmel a pu renforcer de deux façons la virulence du b. du chancre mou. 1) Il injecte d'abord, dans le péritoine d'un cobaye, une solution d'acide lactique, puis une certaine quantité de bacilles de Ducrey-Unna. L'animal meurt de septicémie. Si l'on fait ensuite des passages, en diminuant peu à peu la dose d'acide lactique, on arrive bientôt à tuer avec les cultures seules. 2) Il remplace l'acide lactique par de l'*antialexine* de cobaye et les résultats sont absolument les mêmes.

M. Slatineano a remonté la virulence du b. de Pfeiffer, chez le cobaye, en employant une méthode analogue à la méthode n° 1 de M. Himmel. Le bacille renforcé pouvait tuer seul, dans le péritoine, le cobaye, le lapin et la souris.

Étiologie de la fièvre jaune.

Les expériences que MM. Reed, Carroll et Agramonte se sont crus autorisés à pratiquer sur l'homme, dans l'île de Cuba, conduisent à des conclusions importantes, que nous allons résumer brièvement, d'*après ces auteurs*.

L'agent de la fièvre jaune traverse la bougie Berkefeld et appartient, par conséquent, au groupe des microbes « invisibles ».

Le vomito negro n'est transmis, *dans les conditions naturelles,* que par la piqûre de certains moustiques (culex fasciatus, identique au culex tœniatus de Meigen). Les linges et les vêtements des malades,

ainsi que les diverses marchandises provenant des endroits contaminés, n'offrent aucun danger et leur désinfection est absolument inutile. Les maisons ne sont dangereuses, en pays atteint, que si elles recèlent des culex infectés.

Expérimentalement, on peut réaliser la fièvre jaune en inoculant, sous la peau des gens sains, 1 centimètre cube 1/2 à 2 centimètres cubes de sang, pris dans la veine d'individus malades depuis 1 ou 2 jours. Lorsqu'on veut reproduire le mode naturel de contamination, il suffit de faire piquer les sujets par des moustiques qui ont sucé, au moins 12 jours (automne) ou 18 jours (hiver) auparavant, le sang de malades arrivés au 2e ou 3e jour du vomito. Dans ces diverses conditions, on provoque un typhus amaril type ; si les individus inoculés guérissent, ils montrent par la suite une immunité absolue. La piqûre des culex qui ont sucé, depuis moins de 12 jours, le sang virulent n'engendre ni l'infection, ni l'immunité.

Enfin, l'inoculation de $1^{cmc},5$ de sérum virulent filtré sur Berkefeld produit, 2 fois sur 3, le vomito.

L'incubation de la fièvre jaune expérimentale varie de 41 heures à 5 jours et 17 heures (13 cas).

La théorie de la transmission par les moustiques explique parfaitement les diverses particularités étiologiques du vomito. Elle avait été jadis formulée, mais sans preuves suffisantes à l'appui, par Nott (1871) et Finlay (1881-1886).

Le bacille ictéroïde de Sanarelli, qui n'a rien à voir avec le typhus amaril, serait identique au bacille du hog-choléra (Reed et Carroll).

Affection de l'homme due à un trypanosome.

M. Dutton a rencontré des trypanosomes, en Gam-

bie, dans le sang d'un Européen atteint d'une fièvre rémittente, avec bouffissure de la face, œdèmes des paupières et des membres inférieurs, fréquence anormale du pouls et de la respiration, faiblesse générale et hypertrophie de la rate. C'est le premier exemple d'une affection humaine due aux trypanosomes.

White scour et lung disease.

Sous ces noms, les auteurs anglais désignent deux affections très graves des veaux, qui ont été récemment étudiées en Irlande par M. Nocard. La *white scour* apparaît le plus souvent durant la première semaine et se caractérise par une diarrhée incoercible, blanche et mousseuse. Cette diarrhée fait défaut s'il s'agit de cas très rapides, septicémiques, où l'animal est emporté en quelques heures. Dans la *lung disease*, on a affaire à des phénomènes thoraciques, qui éclatent après 8 ou 10 semaines. La lung disease succède aux formes légères de la white scour.

La white scour offre des lésions très caractéristiques. L'ombilic, volumineux, recèle un caillot mou, quelquefois purulent. On observe des suffusions hémorragiques, le long des vaisseaux ombilicaux et de l'ouraque. Dans les formes rapides, il s'y joint les diverses altérations, habituelles aux septicémies hémorragiques. Dans les cas lents, ces altérations s'atténuent, mais on note des manifestations pulmonaires et articulaires. La lung disease se traduit par des foyers broncho-pneumoniques caséeux ou suppurés.

La white scour est due à une *pasteurella*, souvent difficile à isoler, à cause de la présence concomitante de microbes d'infection secondaire. Ces microbes se retrouvent chez les animaux inoculés avec les cultures pures. La pasteurella de Nocard se montre très viru-

lente ; elle tue facilement le cobaye (dans le péritoine) et le lapin (dans les veines). Elle engendre la maladie chez le veau, lorsqu'on s'adresse à la voie intraveineuse.

La lung disease représente une infection secondaire, occasionnée par la *bacille de Preisz-Nocard*. Ce bacille se développe dans l'organisme, affaibli par l'agent de la white scour. M. Nocard a pu, expérimentalement, reproduire l'affection, en inoculant, en même temps, la pasteurella tuée par la chaleur (voie intra péritonéale) et le b. de Preisz-Nocard vivant (inhalation).

La prophylaxie des deux maladies se trouve donc ramenée à celle de la white scour. Or, celle-ci est due à la pénétration de la pasteurella, par la plaie ombilicale, au moment de la mise-bas. M. Nocard a conseillé, en conséquence, les mesures suivantes : On lave le vagin, lors de la parturition, avec une solution de lysol. On reçoit le veau sur une litière propre. On lie le cordon avec des fils conservés dans le lysol. On badigeonne le vagin avec la solution de Lugol (eau : 1 litre — iode : 2 gr. — iodure de potassium : 4 gr.), on lave ensuite à l'alcool méthylique iodé (2 pour 1000) et on occlut au collodion iodé (1 pour 100). Ces mesures ont été couronnées de succès.

Diarrhée des veaux.

Etudiée, en France, par MM. Lesage et Delmer. Elle paraît identique à la white scour et reconnaît pour cause une *pasteurella*, sans doute très voisine. Pendant la vie, on peut isoler celle-ci du sang par la culture, à moins que la maladie ne date de 10 à 15 jours, auquel cas on échoue régulièrement. Lors de l'agonie, les cultures révèlent souvent la concomitance

du colibacille ou du staphylocoque. La recherche de l'agent pathogène *intra vitam*, dans le mucus nasal et les fèces, nécessite l'inoculation sous la peau du lapin (animal extrêmement sensible). Après la mort, on opère de même, systématiquement, qu'il s'agisse du sang, du mucus nasal, des fèces ou des divers viscères.

De tous les germes contenus dans ces produits, seule la pasteurella se généralise ordinairement chez l'animal infecté. Avec les cultures pures, on peut reproduire aisément l'affection. Il suffit d'inoculer les veaux dans les veines, ou sur la plaie ombilicale, ou encore sous la peau (en associant alors le coli bacille à la pasteurella). Le lapin est infecté sûrement par la voie intranasale.

MM. Lesage et Delmer admettent que, dans les conditions naturelles, les veaux âgés sont toujours contaminés suivant ce dernier mode.

Diphtérie aviaire.

Dans un mémoire récent, M. Guérin a étudié avec détails le microbe déjà signalé par MM. Löffler, Moore, Piana et Galli Valerio, Loir et Ducloux, etc. Ses recherches, que nous résumerons brièvement, l'ont conduit à des résultats importants, touchant la vaccination et la sérothérapie de l'affection.

L'organisme pathogène représente un *cocco-bacille,* doué de mouvements oscillatoires (contestés par M. Nocard, qui rattache ce cocco-bacille au genre *pasteurella*), ne prenant pas le Gram, ne liquéfiant pas la gélatine, ne modifiant pas le lait, ne donnant pas d'indol et, contrairement au microbe de Loir et Ducloux, ne poussant point sur pomme de terre. C'est un anaérobie facultatif. Il se manifeste, en bouillon, sous forme d'un trouble léger ; le mé-

lange de bouillon (8 parties) et de sérum de cheval (1 partie) convient bien mieux pour le développement et la conservation de la virulence.

Les bacilles, isolés des lésions chroniques (parfois même des lésions aiguës), se montrent peu actifs ; on les renforce de la façon suivante. Une parcelle de fausse membrane, recueillie *in vivo* dans le pharynx, ou *post mortem* dans les plèvres ou les sacs aériens, est triturée avec de l'eaus térile. On inocule 1/4 de centimètre cube de l'émulsion, dans le tissu conjonctif de la paupière inférieure du pigeon. L'animal meurt en 10 à 12 heures ; on prélève, au point inoculé, un peu de la fausse membrame caséiforme qui s'y est développée et on fait un passage, selon le même mode. Et ainsi de suite. Après 15 passages, le virus s'est suffisamment exalté pour permettre d'aborder utilement l'étude expérimentale de l'affection. Il tue, à faible dose, le pigeon, le lapin et le cobaye sous la peau, en déterminant chez eux une infection septicémique. Il ne tue la poule que dans les veines et encore inconstamment.

On reproduit aisément, chez les pigeons, les diverses modalités de la maladie naturelle, en souillant les aliments ou les boissons avec des cultures pures. Parfois, c'est la septicémie qui apparaît, mais le plus souvent on observe la forme pseudo-membraneuse ou le type pleuro-pulmonaire. La virulence des excréments des animaux infectés explique bien des modes de la contagion naturelle.

M. Guérin, pour vacciner les pigeons, emploie avec succès le procédé suivant. On fait une première inoculation de culture de 24 heures en bouillon-sérum, chauffée 1 heure à 55° (microbes morts). Cette inoculation se pratique par la voie péritonéale, à la dose de un demi-centimètre cube. 12 jours après, on injecte, dans le péritoine également, un demi-centi-

mètre cube de culture, chauffée 1 heure à 50° (microbes affaiblis). 12 jours après la seconde inoculation, les pigeons supportent, sous la peau, un quart de centimètre cube de virus exalté (dose sûrement mortelle). Pour vacciner les poulets (l'époque la plus favorable de leur vie correspond à l'âge de 2 mois), on procédera de même. Mais, comme il s'agit d'animaux plus résistants que les pigeons, la dose inoculée sera portée, chaque fois, à 1 centimètre cube.

Enfin, M. Guérin a obtenu, en hyperimmunisant les chevaux à l'aide des cultures, un sérum préventif que l'on peut employer, comme il suit, dans la vaccination des pigeons. On injecte 4 centimètres cubes de ce sérum sous la peau des animaux et, 24 heures après, un quart de centimètre cube de culture dans le péritoine.

Inoculation des virus aphteux, peripneumonique et claveleux, dans la mamelle.

MM. Nocard et Roux ont montré que, si on inocule le virus aphteux dans le trayon des vaches laitières, le lait devient virulent et peut conserver cette virulence pendant 8 jours.

Les mêmes auteurs ont obtenu des résultats identiques, en injectant le virus péripneumonique dans les canaux galactophores de la vache en lactation. Mais ici le lait reste infectant durant des mois.

Enfin, M. Borrel, en introduisant le virus claveleux dans le trayon des brebis laitières, a vu le lait devenir virulent pendant 15-20 jours.

Dans ces trois cas, il s'agit d'une infection véritable de la mamelle et non d'une simple culture *in vivo* dans le lait.

Mal de Caderas.

Affection, voisine de la dourine et du surra, qui sévit, dans l'Amérique du Sud, sur les chevaux et les mulets. Elle a été étudiée, par M. Elmassian, dans le Paraguay. Elle se traduit par de l'émaciation, des alternatives de fièvre et d'apyrexie et de la paralysie des membres postérieurs. La mort semble en être la seule terminaison. Parfois, on observe des œdèmes, localisés à la face interne des cuisses et des épanchements articulaires. A l'autopsie, on note de la tuméfaction générale des organes lymphoïdes, des épanchements séro-fibrineux dans les séreuses, de l'hypertrophie du foie et de la rate et, dans certains cas, des foyers d'hémorragie pulmonaire et des plaques d'emphysème sous-pleural.

La maladie est contagieuse, bien que les conditions de la contagion soient encore inconnues. Elle reconnaît pour cause un *trypanosome*, qui apparaît avec l'élévation thermique et disparaît souvent dans les périodes d'apyrexie, ou lorsque la température s'élève trop haut (40°-41°). Après la mort, on ne retrouve point le parasite dans le sang, si l'animal a succombé pendant un moment où il faisait défaut *intra vitam*.

Le trypanosome est inoculable au cheval, au coati (qui contracte une affection curable) et aux petits singes de l'espèce *nyctipithecus felinus*.

Nouvelle maladie des bœufs due à un trypanosome.

M. Theiler, vétérinaire à Pretoria, a découvert récemment un trypanosome qui occasionne une *anémie simple ou pernicieuse* des bovidés. Les autres mammifères se sont montrés réfractaires à l'infection

expérimentale. Le trypanosome des bovidés diffère de tous ceux des mammifères actuellement connus, en ce que ses dimensions sont à peu près doubles (Laveran, Bruce).

Recherche du bacille typhique.

Procédé de M. Cambier.

Il a été indiqué, comme il suit, par son auteur, dans une courte note, présentée à l'Académie des Sciences. « On dispose, dans un large tube de verre, « fermé à une extrémité, une bougie de porcelaine « suffisamment poreuse ; tube et bougie sont à demi « remplis de bouillon et stérilisés à 110°. Si on en- « semence, avec précaution, le bouillon contenu à « l'intérieur de la bougie, au moyen d'une culture « typhique pure, on peut constater déjà, après quel- « ques heures d'étuve à 37°, que le bouillon entou- « rant la bougie, qui était d'abord parfaitement « limpide, présente maintenant un louche manifeste, « traduisant le passage du bacille à travers la bougie ; « d'autres espèces microbiennes sont capables de « traverser les parois des bougies que nous utilisons ; « cependant, de toutes ces espèces banales, que nous « avons examinées jusqu'ici, aucune ne passe aussi « vite que le b. typhique.

« Cette curieuse propriété du bacille typhique m'a « suggéré l'idée de le rechercher, dans l'eau, de la « façon suivante : on sème une certaine quantité de « l'eau à éprouver dans l'intérieur de la bougie, « placée comme il vient d'être dit, dans un litre de « bouillon à 38°.

« Dès qu'un louche se manifeste dans le bouillon « extérieur, à l'aide d'une pipette effilée, on prélève « une prise, que l'on ensemence sur les milieux de

« différenciation habituels. Dans les cas les plus fa-
« vorables, on peut, en 18 ou 20 heures, être fixé
« sur la présence du bacille typhique dans un échan-
« tillon d'eau ; seules, les méthodes de différenciation
« qu'il faudra toujours appliquer aux bacilles isolés
« par culture en bougie, retarderont de 2 ou 3 jours
« le diagnostic. »

M. Cambier, grâce à cette méthode, a pu extraire le b. typhique des eaux de la Seine et de la Marne.

Procédé de M. Chantemesse.

M. Chantemesse filtre plusieurs litres d'eau sur une bougie Chamberland. Cette bougie est disposée dans un appareil spécial, pour la description duquel nous renvoyons au travail original de l'auteur. Le dépôt, abandonné à la surface de la bougie, est mis en suspension, à 37°, dans de l'eau peptonisée (3 pour 100). Pendant l'opération, on fait barboter de l'air au sein du liquide ; de plus, celui-ci est renouvelé 1 à 2 fois, à 12 heures d'intervalle. Puis, on centrifuge la culture, riche et impure ainsi obtenue, de manière que les espèces immobiles ou réunies en zooglées se déposent, tandis que les bacilles typhiques (mobiles et isolés) demeurent en suspension. On ensemence le liquide, surmontant le dépôt, dans de la gélose peptonisée (3 pour 100) et phéniquée (1 pour 1 000), roulée en tubes d'Esmarch, afin de n'obtenir que des colonies superficielles, parmi lesquelles on recherche celles qui répondent au b. d'Eberth.

M. Pottevin, qui a contrôlé la valeur de cette méthode, l'a trouvée excellente.

Addendum au Formulaire.

Par suite d'une erreur de classement, les deux formules suivantes se sont trouvées omises.

Liquide de Fränkel.

Eau	1 000 grammes.
Chlorure de sodium.	5 —
Phosphate dipotassique.	2 —
Asparagine.	4 —
Lactate d'ammoniaque..	6 —

Liquide de Raulin.

Eau.	1 500 grammes.
Sucre candi.	70 —
Acide tartrique.	4 —
Nitrate d'ammonique.	4 —
Phosphate d'ammoniaque..	0gr,6
Carbonate de potasse.	0gr,6
Carbonate de magnésie.	0gr,4
Sulfate d'ammoniaque..	0gr,25
Sulfate de fer.	0gr,07
Sulfate de zinc.	0gr,07
Silicate de potasse.	0gr,07

En terminant cet ouvrage, nous nous faisons un plaisir de signaler, à ceux de nos lecteurs qui se trouvent chargés d'un enseignement bactériologique, la belle collection de planches murales publiée par l'Institut Pasteur, sous la direction du Dr Borrel, auquel est dû le texte explicatif qui accompagne la publication.

ERRATA

—

Page 10, fig. 4. *Au lieu de* : Étuve de Roux *lire* : Étuve de Schribeaux avec régulateur de Roux.

— 135, ligne 20. *Au lieu de* : la part des organismes ensemencés *lire* : de la part des organismes ensemencés.

— 147, ligne 16. *Au lieu de* : suffirait simplement *lire* : suffirait amplement.

— — *Au lieu de* : fig. 67 *lire* : fig. 71.

— 262, ligne 23, *Au lieu de* : mal obturutée *lire* : mal obturée.

— 263, ligne 16. *Au lieu de* : qui inoculèrent l'homme *lire* : qui inoculèrent à l'homme.

— 349, ligne 31. *Au lieu de* : souvent plus de simplicité *lire* : souvent pour plus de simplicité.

— 384, Supprimer la parenthèse qui va de la 21e à la 26e ligne.

— 507, ligne 25 et suivantes. *Au lieu de* : à la surface des anses in-on-testinales et du foie ne rencontre *lire* : à la surface des anses intestinales et du foie, on ne rencontre.

— 581, ligne 20. *Au lieu de* : Les spores ne se sont jamais *lire* : les spores ne sont jamais.

— 595, *Au lieu de* : fig. 139 *lire* : fig. 138. — Toutes les figures suivantes portent un numéro trop élevé d'une unité.

— 649, ligne 3. *Au lieu de* : Au point de la virulence *lire* : Au point de vue de la virulence.

— 651, ligne 29. *Au lieu de* : Rhinosclérisme *lire* : Rhinosclérome.

— 688, ligne 19. *Au lieu de* : Réaction idol-nitreuse *lire* : Réaction indol-nitreuse.

— 727, *Au lieu de* : 3 à 5 cas pour 1 000 *lire* : 3 à 5 cas pour 100.

— 738, *Au lieu de* : no retrouve *lire* : on retrouve.

— 877, *Après* : lorsqu'ils sont liquides *fermer la parenthèse.*

— 885, *Au lieu de* : crytocoque *lire* : cryptocoque.

TABLE ALPHABÉTIQUE

A

Abattoir (Manière de recueillir le sérum à l'abattoir), 147.
Acétique (Fermentation), 346.
Achorion Schönleini, 580.
Acides (Couleurs), 303.
Acides (Production d'), 355.
Actinomycose, 564.
Actinomyces (Coloration de l'), 334.
Aérogenes (Bacillus), 652.
Aéroscopes, 935.
Affaiblissement (Vaccins obtenus par), 406.
Agents de différenciation, 304.
Agglutinantes (Propriétés), 478.
Agglutinines, 479.
Agoniques (Infections), 271.
Aiguilles de verre, 155.
Air (Contagion par l'), 945.
Air (Analyse bactériologique de l'), 935.
Alcali (Production d'), 356.
Alcool (comme fixateur), 283.
Alcoolique (Fermentation), 343.
Alexines, 433.
Aliments (Analyse des), 963.
Amibes (Culture des), 996.
Amidon (Fermentation de l'), 345.
Amidon (Gelée d'), 136.
Ammoniacale (Fermentation), 346.
Ampoules de Geissler, 295.
Amylase, 351.
Amylomyces Rouxii, 345-351.
Anaérobies de Flügge, 977.
Anaérobies en général, 180.
Anaérobies de Veillon, 755.
Analyse de l'air, 935.
Analyse des aliments, 963.
Analyse des boissons, 933.
Analyse des eaux, 906.
Analyse des glaces, 933.
Analyse des huîtres, 970.
Analyse du lait, 972.
Analyse des poussières, 944.
Analyse du sol, 951.
Anasarque du cheval, 832.
Anderson (Système), 929.
Anesthésie des animaux, 239.
Angine de Vincent, 739.
Aniline (Eau d'), 994.
Animales (Autopsies), 272.
Animales (Infusions), 100.
Animaux (Anesthésie des), 239.
Animaux (Contention des), 237.
Animaux (Degré de réceptivité des), 230.
Animaux (Élevage des), 204.
Animaux (Maladies des), 206.
Animaux (Nourriture des), 204.

Animaux (Observation des), 260.
Animaux (Résistance des), 256.
Animaux (Température des), 260.
Anopheles, 793.
Anticholérique (Vaccination), 688.
Anticoagulantes (Substances), 114.
Anticorps, 480-484.
Antidiphtérique (Sérum), 459.
Antimicrobiens (Sérums), 475.
Antirabique (Vaccin), 406.
Antiseptiques (Action des), 371.
Antiseptiques (Stérilisation par les), 78.
Antispermotoxine, 491.
Antitétanique (Sérum), 470-520.
Antitoxiques (Sérums), 479.
Appareil à filtration de Martin, 71.
Appareils à filtrer, 70.
Appareils à vide, 13.
Appareil Büdenberg, 9.
Appareil Chamberland (filtration par aspiration), 70.
Appareil Chamberland (filtration par pression), 73.
Appareil Latapie (contention des animaux), 238.
Appareils Latapie (pour recueillir le sérum), 143-144.
Appareil de Pfeiffer, 298.
Appareil de Schültze, 298.
Appareil de Würtz, 193.
Araignée (Microbe de l'), 834.
Arsenic (Recherche de l'), 337.
Arsonval (Bougie de d'), 69.
Arsonval (Étuve à eau de d'), 13.
Ascitique (Manière de recueillir la sérosité), 146.
Aspergillose, 575.
Aspergilloses cutanées, 789.
Aspiration (Filtration par), 70.
Asporogénie (Production de l'), 377.
Assimilation, 353.
Atténuation (Vaccins obtenus par), 404.
Augmentation de la virulence, 399.
Aurea (Streptothrix), 769.
Autoclave, 7-61.
Autopsies animales, 272.
Autopsies humaines, 270.
Autospermotoxine, 491.
Aviaire (Diphtérie), 1007.
Aviaire (Pasteurellose), 801.
Aviaire (Tuberculose), 532.
Azote (ammoniacal dans l'eau), 920.
Azote (nitrique dans l'eau), 920.

B

Bacille du chancre mou, 712-1003.
— du choléra, 678.
— cyanogène, 973.
— diphtérique, 624.
— diphtérique (Immunisation contre le), 459.
— d'Eberth, 595.
— d'Eberth (Immunisation contre le), 451.
— d'Eberth (recherche dans l'eau), 914.
— de Friedländer, 646.
— fusiforme, 735-739.
— du hog-choléra, 810.
— ictéroïde, 744.
— lactique de Pasteur et Hüppe, 975.
— de la lèpre, 701.
— de la morve, 522.
— du mucus nasal, 548.

Bacille de l'ozène, 650.
— de la peste, 639.
— de la peste (Immunisation contre le), 454.
— de Pfeiffer, 715-1003.
— de Pfeiffer (Poison du), 391.
— de Pottien, 676.
— de Preisz-Nocard, 835.
— pseudo-butyrique de Hüppe, 982.
— pseudo-diphtérique, 229.
— de la psittacose, 560.
Bacille pyocyanique, 363-671.
Bacille pyocyanique (Immunisation contre le), 448.
Bacille pyocyanique (Variété mélanogène du), 999.
Bacille du rhinosclérome, 650.
— du rouget, 812.
— du rouget (Immunisation contre le), 447.
— tétanique, 514.
— tétanique (Immunisation contre le), 470.
— de la tuberculose, 531.
— de la verruga, 552.
— de Weeks-Morax, 732.
Bacilles anaérobies de Flügge, 977.
— encapsulés, 645.
— peptonisants de Flügge, 982.
— de Möller, 550.
— pseudo-tuberculeux, 980-982.
— du smegma, 549.
— verts fluorescents, 676.
Bacillus aërogenes, 652.
— botulinus, 966.
— botulinus (Immunisation contre le), 459.
— butyricus de Botkin, 976.
— Chauvœi, 817.
Bacillus Chauvœi (Poison du), 386.
— Chauvœi (Immunisation contre le), 458.
— enteritidis, 964.
— enteritidis sporogenes, 979.
Bacillus fragilis, 758.
— funduliformis, 760
— furcosus, 760.
— fusiformis, 759.
— Hessii, 977.
— lacticus de Günther et Thierfelder, 976.
— lactis aërogenes, 975.
— lactis erythrogenes, 974.
— lactis niger, 974.
— lactis pituitosi, 978.
— nebulosus, 756.
— perfringens, 756.
— prodigiosus, 361.
— radiiformis, 761.
— ramosus, 758.
— serpens, 761.
— synxanthus, 974.
— thetoïdes, 760.
— viridis, 677.
— viscosus lactis, 978.
Bactéricides (Substances), 433.
Bactéridie charbonneuse, 497.
Bactéridie charbonneuse (Immunisation contre la), 456.
Bactéridie charbonneuse (isolement dans le sol), 954.
Bactéries des légumineuses, 958.
Bacterium coli, 614-826.
Bain-marie de Wiessnegg, 65.
Balances, 14.
Ballon-pipette Chamberland, 83.
Barbone des buffles, 805.
Basiques (Couleurs), 301.
Basophiles (Granulations), 416.

Bassenge (Procédé), 931.
Becs Bunsen, 15.
Berkefeld (Bougie), 69.
Berthier (Boîte de), 90.
Beurre (Étude bactériologique du), 982.
Blastomycètes (Affections animales à), 884.
Blastomycètes (Affections humaines à), 771.
Blennorrhagie, 706.
Bleu Borrel, 337.
Bleu de Koch, 992.
Bleu de Kühne, 992.
Bleu nitrique de Fränkel, 993.
Bleu polychromatique, 306.
Bleu de Roux et Yersin, 993.
Bleu de Sahli, 992.
Boîte de Berthier, 90.
— Kitasato, 198.
— Pétri, 89.
— à rainures, 89.
— de Voges, 237.
Bœuf (Hématozoaires du), 890.
Bonome (Streptocoque de), 724.
Bordas et Girard (Procédé), 931.
Borrel (Méthode de), 998.
Botryomycose, 572.
Böttcher (Cellule de), 295.
Botulique (Poison), 382.
Botulisme, 966.
Bouchage à l'ouate, 91.
Bougie d'Arsonval, 69.
— Chamberland, 67.
— Berkefeld, 69.
Bougies filtrantes en général, 67.
Bouillon classique, 100.
— glycériné, 106.
— glycériné et sucré, 106.
— de haricots, 99.
— Martin, 103.
Bouillon de poisson, 105.
— de pommes de terre, 97.
— sang, 106.
— sérum, 106.
— sucré et carbonaté, 107.
Bourres insolubles, 937.
Bourres solubles, 938.
Bouton d'Alep (Streptocoque du), 667.
Bovidés (Coryza gangreneux des), 827.
Bovidés (Maladies des), 217.
Bovine (Pasteurellose), 805.
Bradsot, 824.
Brisou (Coccus), 630.
Buchner (Tube de), 196.
Büdenberg (Appareil), 9-58.
Bunsen (Becs de), 15.
Butyricum (Clostridium), 976.
Butyricus (Bacillus) de Botkin, 976.
Butyrique (Fermentation), 344.

C

Canine (Pasteurellose), 803.
Caoutchouc (Capuchons de), 93.
Capaldi et Proskauer (Liquide de), 991.
Caprine (Pasteurellose), 807.
Capsules (Coloration des), 327.
Capuchons de caoutchouc, 93.
Carafe à filtrer de Kitasato, 70.
Caratés, 789.
Carceag, 895.
Carmin, 306.
Carmin de Partsch-Grenacher, 417.
Carotide (Inoculation dans la), 250.
Caséase, 350.

Cathelineau (Liquide), 991.
Causes nuisibles (Action des), 366.
Celloïdine, 287.
Cellule de Böttcher, 295.
Cellule de Koch, 295.
Cellule de Nikiforoff, 296.
Centrifugeurs, 20.
Céphalo-rachidien (Prélèvement du liquide), 268.
Chabaud (Injecteur de), 25.
Chaleur humide (Action de la), 369.
Chaleur humide (Stérilisation par la), 57.
Chaleur sèche (Action de la), 368.
Chaleur sèche (Stérilisation par la), 54.
Chamberland (appareil pour la filtration par aspiration), 70.
Chamberland (appareil pour la filtration par pression), 73.
Chamberland (Autoclave), 7, 61.
Chamberland (Ballon-pipette), 83.
Chamberland (Bougie), 67.
Chambre-étuve, 167.
Chambre humide (Examen en), 294.
Chambre humide de Ranvier, 294.
Chancel (Régulateur), 163.
Chancre mou, 712-1003.
Changements de réaction des milieux, 355.
Chantemesse (Four), 7.
Charbon bactéridien, 497.
Charbon symptomatique, 817.
Charbon symptomatique du porc, 825.
Charbon symptomatique (Vaccin du), 408.
Charbonneux (Poison), 390.
Charbonneux (Vaccins), 405.
Chauffage discontinu (Stérilisation par le), 65.
Cheval (Hématozoaire du), 895.
Cheval (Microsporon du), 882.
Chèvres (Pneumonie des), 807.
Chien (Hématozoaire du), 894.
Chien (Microsporon du), 882.
Chimiotaxie, 425.
Chimique (analyse c. des eaux), 919.
Chimiques (Milieux), 95.
Chloroforme (Stérilisation par le), 79.
Chlorures dans l'eau, 920.
Choléra (Bacille du), 678.
Choléra des poules, 215-801.
Choléra des poules (Poison du microbe du), 391.
Choléra des poules (Vaccin du), 404.
Choléra-sérum, 476.
Cholérique (Poison), 388.
Chromogènes (Microbes), 361.
Cidre (Analyse du), 933.
Cils (Coloration des), 329-997.
Cils (Perte des), 378.
Citrate de soude, 115.
Clarke (Système), 929.
Claude Bernard (Gouttière de), 239.
Claudius (Méthode de), 317-324.
Clavelée, 876.
Clavelisation, 878.
Coagulateur de Koch, 13-150.
Coagulation du lait, 110.
Coagulation du sérum, 149.
Coagulines, 479.
Cobayes (Pneumonie des), 211-212.
Cobayes (Pseudo-tuberculose des), 212.
Cobayes (Septicémie des), 210.

Coccidiase des lapins, 209.
Cocco-bacillaire (Pseudo-tuberculose), 555.
Cocco-bacille de Veillon et Morax, 756.
Coccus Brisou, 630.
Coccus de Keferstein, 974.
Cohn (Liquide de), 96-988.
Colibacilles (Affections animales à), 826.
Colibacilles (Affections humaines à), 614.
Colibacille (caractères différentiels avec le b. d'Eberth), 618.
Colibacille (Immunisation contre le), 452.
Colibacille (recherche dans l'eau), 914.
Colibacille (Variétés du), 620.
Colibacilloses des oiseaux, 214.
Collage des coupes, 287.
Colorantes (Matières), 301.
Coloration des capsules, 327.
Coloration des cils, 329-997.
Coloration des coupes, 321.
Coloration des protozoaires, 336.
Coloration des spores, 326.
Coloration directe, 309-321.
Compte-globules Thoma-Zeiss, 419.
Condensateurs, 41.
Conjonctivite aiguë contagieuse, 733.
Conjonctivite diplo-bacillaire, 731.
Conservation des semences, 160.
Conservation de la virulence, 410.
Contagion par l'air, 945.
Contention des animaux, 237.
Corps des microbes (Poisons du), 394.
Coryza gangreneux des bovidés, 827.
Couleurs acides, 303.
Couleurs basiques, 301.
Couleurs naturelles, 303.
Coupes (Coloration des), 321.
Coupes (Préparation des), 281.
Crachats (Prélèvement des), 268.
Crésyl, 226.
Cryptocoque, 884.
Culture des amibes, 996.
Culture des anaérobies, 180.
Cultures en bouillon (Caractères des), 107.
Cultures en gélatine (Caractères des), 123.
Cultures en milieux liquides, 155.
Cultures sur milieux solides, 158.
Curtis (Saccharomyces de), 771.
Cyanogène (bacille), 973.
Cytases, 433, 476, 482, 1001.
Cytodiagnostic, 423.
Cytotoxines, 481.

D

D'Arsonval (Régulateur de), 164.
Debrand (Procédé de), 197.
Décolorants, 304.
Dégénérés (Coloration des microbes), 335.
Dénitrifiants, 958.
Désassimilation, 354.
Désinfection (Etuves à), 9.
Dessiccation, 367.
Dextrinase, 351.
Diapédèse, 429.
Diaphragme (Inoculation dans le), 251.
Diarrhée des veaux, 826-1006.
Diastases, 349.

Différenciation (Agents de), 304.
Diminution de la virulence, 403.
Diphtérie, 624.
Diphtérie aviaire, 216-1007.
Diphtérique (Poison), 387.
Diphtérique (Sérothérapie anti), 636.
Diplo-bacille de Morax, 731.
Diplococcus reniformis, 763.
Directe (Coloration), 309-321.
Double coloration, 312, 315, 322, 323.
Dourine, 896.
Ducrey (Strepto-bacille de), 712.
Duodénum (Injection dans le), 254.
Dysenteria alba, 826.

E

Eau d'aniline, 994.
Eau de levure, 98.
Eau de malt, 99.
Eaux (Analyse des), 906.
Eaux d'égout (Épuration des), 925.
Eaux gazeuses, 932.
Eaux minérales, 931.
Eaux (Purification des), 925.
Ébullition (Isolement des anaérobies par l'), 182.
Ébullition (Stérilisation par), 57.
Échanges nutritifs, 353.
Ehrlich (Méthode d'), 317-325.
Ehrlich (Mélange triacide d'), 415.
Élevage des animaux, 204.
Elsner (Méthode d'), 603-915.
Elsner (Milieu d'), 124.
Empiriques (Milieux), 97.
Encapsulés (Bacilles), 645.
Encre de fuchsine, 330.
Endermiques (Inoculations), 243.
Enquête sur les eaux de boisson, 923.
Ensemencements, 154.
Ensemencement négatif, 176.
Enteritidis (bacillus), 964.
Enteritidis sporogenes (Bacillus), 979.
Éosinophiles (Granulations), 413.
Épanchements (Prélèvement des), 267.
Eppinger (Streptothrix d'), 768.
Équidés (Maladies des), 217.
Équine (Pasteurellose), 804.
Erlenmeyer (Fiole d'), 87.
Érysipéloïde de Rosenbach, 768.
Escherich (Bacille d'), 614.
Esmarch (Méthode d'), 171.
Essences (Stérilisation par les), 79.
Etat frais (Examen à l'), 292.
Ether (Stérilisation par l'), 79.
Etuves, 9.
Etuves à air, 11.
Etuves à eau, 13.
Etuve de Gay-Lussac, 22.
Etuve Vaillard et Besson, 9.
Etuves (Réglage des), 162.
Exsiccateurs, 26.
Exsudats bucco-pharyngés (Prélèvement des), 267.
Extraits leucocytaires, 439.
Extrait de Lustig et Galeotti, 397.
Extrait de sangsues, 115.

F

Farcin du bœuf, 843.

Favus, 580.
Favus des animaux, 882.
Fécule (Gélatine à la), 126.
Fermentations, 342.
Fermentation acétique, 346.
— alcoolique, 343.
— de l'amidon, 345.
— ammoniacale, 346.
— butyrique, 344.
— du képhir, 978.
— lactique, 343.
— des sucres, 346.
— visqueuse, 977.
Ferments nitreux, 347.
Ferment nitrique, 349.
Fernbach (Matras de), 88.
Fièvre aphteuse, 857.
— jaune, 744-1003.
— de Malte, 727.
— récurrente, 751.
— du Texas, 890.
— typhoïde, 595.
— typhoïde (Sérothérapie de la), 1002.
Fil de platine, 154.
Filtrantes (Galeries), 929.
Filtration, 67.
— par aspiration, 70.
— par pression, 73.
— (Théorie de la), 76.
Filtres de sable, 928.
Fiole d'Erlenmeyer, 87.
Fiole de Gayon, 87-90.
Finkler et Prior (Vibrion de), 688.
Fixateurs (Agents), 282.
Fixation, 281-308.
Flacon de Freudenreich, 87.
Flügge (Bacilles peptonisants de), 982.
Flügge (Bacilles anaérobies de), 977.
Flügge (Gouttelettes de), 946.
Fluorescéine, 924.
Fluoroscope, 924.
Fœtidus (Micrococcus), 763.
Foie (Inoculation dans le), 250.
Foin (Infusion de), 98.
Formes involutives (Production des), 376.
Four à flamber, 7-54.
Four Chantemesse, 7-54.
Four Pasteur, 7-54.
Fragilis (Bacillus), 758.
Fränkel (Bleu nitrique de), 993.
— (milieu), 96.
— (Tube de), 199.
— (Vert acétique de), 993.
Freudeurich (Flacon de), 87.
Friedländer (Pneumobacille de), 646.
Fromages (Étude bactériologique des), 984.
Fuchsine (Encre de), 330.
Fumiers (Microbes des), 956.
Funduliformis (Bacillus), 760.
Furcosus (Bacillus), 760.
Fusiforme (Bacille), 735-739.
Fusiformis (Bacillus), 759.

G

Gale des lapins, 206.
Galeries filtrantes, 929.
Gay Lussac (Étuve de), 22.
Gayon (Fiole de), 87-90.
Gayon (Tube de), 86.
Gaz inertes (Emploi des), 184.
Geissler (Ampoules de), 295.
Gélatine, 117.
Gélatine (Caractères des cultures dans la), 123.
Gélatine à la fécule, 126.
Gélatine de Piorkowski, 126.
Gélatine au raisin 124.
Gélatine de Remy, 127.
Gelée d'amidon, 136.

Gelées de lichen, 133.
Gélose, 128.
Gélose-gélatine, 131.
Gélose glycérinée, 132.
Gélose glycérinée et sucrée, 132.
Gélose de Pfeiffer, 132.
Gélose de Tochtermann, 131.
Gélose de Wertheim, 132.
Germes (Isolement des), 174.
Germes (Numération des), 168.
Germes (Séparation des), 170.
Gessard (Liquide de), 991.
Gibbs (Mélange de), 994.
Giroud (Régulateur), 74.
Glaces, 933.
Glacière, 14.
Gomme adragante (Milieux à la), 133.
Gonocoque, 706.
Gosio (Liquide), 990.
Gosio (Méthode de), 357.
Gourme, 830.
Gouttelettes de Flügge, 946.
Gouttière de Claude Bernard, 239.
Gouttière de Verdin, 239.
Gram (Liquide de), 304.
Gram (Méthode de), 312-323.
Granulations basophiles, 416.
— éosinophiles, 414.
— neutrophiles, 417
— pseudo-éosinophiles, 416.
Grasbacilli, 550.
Grimbert (Milieu de), 125.
Grossissement, 44.
Grüby (Tondante de), 786.
Guttulatus (Saccharomyces), 995.

H

Haffkine (Méthode d'), 699.
Haffkine (Vaccin d'), 396.
Halteridium, 889.
Haricots (Bouillon de), 99.
Hémamœboses des oiseaux, 887.
Hémamœbose du singe, 890.
Hématéine, 306.
Hématotoxines, 490.
Hématozoaire du paludisme, 790.
Hématozoaires (Affections animales à), 887.
— (Coloration des), 336.
— (recherche dans les coupes), 997.
Hémolysines, 394.
Hémonucléotoxines, 487.
Hémotoxines, 484.
Herpès contagieux des poulains, 882.
Hessii (Bacillus), 977.
Hépatotoxines, 494.
Hoffmann (Bacille d'), 629.
Hog-choléra, 810.
Hog-choléra (Immunisation contre le).
Högyes (Méthode d'), 407.
Homme (Infections expérimentales produites chez l'), 262.
Horse-Sickness, 862.
Houille (Microbes de la), 957.
Humaines (Autopsies), 279.
Humeur aqueuse, 113.
Huîtres (Analyse des), 970.
Hydrogène (Emploi de l'), 184.
Hydrogène sulfuré (Dégagement d'), 359.
Hyperleucocytose, 428.
Hypoleucocytose, 428.

I

Ictéroïde (Bacille), 744.
Immunisation, 445.

Immunité, 443.
Improvisés (Laboratoires), 34.
Inclusion, 284.
Indol (Production d'), 354.
Indulinophiles (Granulations), 416.
Infections agoniques, 271.
Infections post mortem, 270.
Influenza (Bacille de l'), 715.
Influenza des lapins, 208.
Influenza (Pseudo-bacille de l'), 720.
Infusions animales, 100.
Infusion de foin, 98.
Infusion de paille, 98.
Infusion de touraillons, 99.
Infusions végétales, 97.
Ingestion (Inoculation par), 252.
Inhalation (Inoculation par), 252.
Injecteurs, 224.
Injecteur de Chabaud, 25.
Injection (Inoculation par), 241.
Inoculations, 219.
Inoculations dans la carotide, 250.
— dans le diaphragme, 251.
— endermiques, 243-255.
— dans le foie, 250.
— par ingestion, 252.
— par inhalation, 252.
— intracrâniennes, 246-255.
— intraganglionnaires, 252.
— intramusculaires, 244-255.
— intranasales, 252.
— intra-oculaires, 247-255.
Inoculations intrapéritonéales, 244-255.
— intrapleurales, 245.
— intrarachidiennes, 249.
— intratrachéales, 248-256.
— intratesticulaires, 249.
— intraveineuses, 247-256.
— dans les os, 251.
— dans le rein, 250.
— sous-cutanées, 242-254.
— (Soins à prendre après les), 260.
Insertion (Inoculation par), 241.
Isolement des germes, 174.
Invertine, 352.
Involution (Production des formes d'), 376.

K

Keferstein (Coccus de), 974.
Képhir (Fermentation du), 978.
Kerion Celsi, 785.
Kitasato (Boîte de), 198.
Kitasato (Carafe de), 70.
Koch (Bleu de), 992.
Koch (Cellule de), 295.
Koch (Coagulateur de), 13-150.
Koch (Méthode de), 173.
Koch (Plaques de), 90.
Koch (Stérilisateur de), 58.
Koumys, 979.
Krauss (Centrifugeur de), 20.
Kühne (Bleu de), 992.
Kühne (Kristalviolett de), 993.
Kühne (Procédé de), 319-325.

L

Laboratoires improvisés, 34.
Lacticus (Bacillus de Gunther et Thierfelder), 976.
Lactique (Bacille de Pasteur et Hüppe), 975.
Lactique (Fermentation), 343.
Lactis aërogenes (Bacillus), 975.
Lactis erythrogenes (Bacillus), 974.
Lactis niger (Bacillus), 974.
Lactis (B. l. pituitosi), 978.
Lactis (B. viscosus), 978.
Lait, 109.
Lait (Analyse du), 972.
Lait bleu, 972.
Lait (Coagulation du), 110.
Lait (Bacilles tuberculeux dans le), 979.
Lames, 51.
Lames (Colorations sur), 308.
Lamelles, 51.
Lamelles (Colorations sur), 310.
Larmes (Prélèvement des), 267.
Lapins (Coccidiose des), 207.
Lapins (Gale des), 206.
Lapins (Influenza des), 208.
Lapins (Pasteurellose des), 208.
Lapins (Pseudo tuberculose des), 209.
Lapins (Septicémie des), 208-803.
Lapins (Trypanosome des), 207.
Latapie (appareils pour contention), 238.
Latapie (appareils pour la récolte du sérum), 143-144.
Légumineuses (Bactéries des), 958.
Lepidophyton, 789.
Lèpre (Bacille de la), 701.
Lésions locales, 261.
Leucocidines, 393.
Leucocytaires (Extraits), 439.
Leucocytes, 413.
Leucocytes (Lysines des), 438.
Leucocytes (Numération des), 419.
Leucotoxines, 488.
Levures (Coloration des noyaux des), 339.
Levure (Eau de), 98.
Lichen (Gelées de), 133.
Liquides Capaldi et Proskauer, 991.
Liquide Cathelineau, 991.
Liquide céphalo-rachidien (Prélèvement du), 268.
Liquide de Cohn, 96, 988.
— de Gessard, 991.
— de Gram, 304.
— de Gosio, 990.
— de Jaksch, 988.
— de Maassen, 989-96.
— de Mayer, 988.
— de Pasteur, 96, 987, 988.
— de Péré, 989.
— de Proskauer et Beck, 990.
— de Raulin, 96.
— de Scheurlen, 990.
— d'Uschinsky, 989.
Liquides (Milieux), 95.
Liquides minéraux, 95.
Liquides organiques naturels, 109.
Locales (Lésions), 261.
Löffler (Bacille de), 624.
Löffler (Bleu de), 992.
Lubimoff (Fuchsine de), 993.
Lumière (Action de la), 370.
Lumineux (Microbes), 365.
Lung Disease, 1005.
Lustig et Galeotti (Extrait de), 397.
Lutage à la paraffine, 294.
Lymphangite épizootique du cheval, 884.

Lymphangite pseudo-farcineuse, 835.
Lymphocytes, 413.
Lysines des leucocytes, 438.
Lysines du sérum, 433.

M

Maassen (Liquide de), 96-989.
Macération de viande, 105.
Macrocytase, 1001.
Maladies des animaux de laboratoire, 206.
Malassez (Mors de), 238.
Malléine, 392.
Malléinisation, 530.
Malt (Eau de), 99.
Maltase, 351.
Malte (Fièvre de), 727.
Mammite contagieuse des vaches, 829.
Mammite gangreneuse des brebis, 834.
Margarine, 983.
Marmier (Milieu), 97.
Martin (Bouillon), 103.
Martin (Appareil à filtration de), 71.
Matière organique des eaux, 920-922.
Matières colorantes, 301.
Matras de Fernbach, 88.
Matras Pasteur, 87.
Mayer (Liquide de), 96, 988.
Mélange de Gibbs, 994.
Méningite cérébro-spinale, 722.
Méningocoque, 722.
Mercure (Pompe à), 186.
Mérieux (Procédé de), 315.
Méthode de Claudius, 317-324.
— d'Ehrlich, 317-325.
— d'Elsner, 603.
— d'Esmarch, 171.
— de Gram, 312-323.
— d'Högyes, 407.
Méthode de Koch, 173.
— de Nissl, 323.
— de Remy, 604.
— de Tyndall, 65.
Microbes (Nutrition des), 342.
Microbes chromogènes, 361.
Microbes dégénérés (Coloration des), 335.
Microbes lumineux, 365.
Microbes des nodosités, 353.
Micrococcus fœtidus, 763.
Micrococcus melitensis, 727.
Microcytase, 1001.
Microscopes, 38.
Microsporon Audouini, 786.
Microsporon du cheval, 882.
Microsporon du chien, 882.
Microsporon furfur, 787.
Microtomes, 19-287.
Milieu Fränkel, 96.
— Elsner, 124.
— Grimbert, 124.
— Marmier, 97.
Milieux chimiques, 95.
Milieux de culture en général, 94.
Milieux empiriques, 97.
Milieux liquides, 95.
Milieux liquides (Cultures en), 155.
Milieux liquides solidifiés, 117.
Milieux solides, 117-134.
Milieux solides (Cultures sur), 158.
Milieux à base de sérum, 138.
Minéraux (Liquides), 95.
Miquel (Tube de), 83.
Mise au point, 45.
Mise en culture, 159.
Mistbacillus, 550.
Mobilité (Etude de la), 424.
Moitessier (Régulateur de), 4.
Möller (Bacilles de), 550.
Mononucléaires, 413.
Mononucléose, 431.

Morax (Diplo-bacille de), 731.
Mordants, 304.
Mors de Malassez, 238.
Morve, 522, 1001.
Moules (Analyse des), 971.
Mouton (Hématozoaires du), 895.
Mucus nasal (Pseudo-bacille tuberculeux du), 548.
Muguet, 774.
Myxosporidies (Coloration des), 337.

N

Nagana, 903.
Nährstoff Heyden, 544.
Naturelles (Couleurs), 303.
Naturels (Liquides organiques), 109.
Nebulosus (Bacillus), 756.
Négatif (Ensemencement), 176.
Néphrotoxines, 492.
Nettoyage de la verrerie, 91.
Neutrophiles (Granulations), 416.
Névrotoxines, 492.
Nigrum (Spirillum), 762.
Nikiforoff (Cellule de), 296.
Nissl (Méthode de), 323.
Nitreux (Ferments), 347.
Nitrifiants, 957.
Nitrification, 347.
Nitrique (Ferment), 349.
Nitrites (Production de), 355.
Nodosités (Microbes des), 353.
Noyaux des bactéries (Coloration des), 339.
Noyaux des levures (Coloration des), 339.
Noyaux des protozoaires (Coloration des), 337.
Nourriture des animaux, 204.
Numération des germes, 168.
Numération des leucocytes, 419.
Nuisibles (Action des causes), 366.
Nutritifs (Echanges), 353.
Nutrition des microbes, 342.

O

Objectifs, 42.
Obermeier (Spirille d'), 751.
Observation des animaux, 260.
Oculaires, 42,
Œufs, 111.
Oïdium albicans, 774.
Oies (Spirillose des), 216-841.
Oiseaux (Colibacillose des), 214.
— (Diphtérie des), 216.
— (Hœmamœboses des), 887.
— (Pasteurellose des), 215.
Onychomycoses, 785.
Organiques (Liquides), 109.
Os (Inoculation dans les), 251.
Ouate (Bouchage à l'), 91.
Ovine (Pasteurellose), 806.
Oxydation (Phénomènes d'), 356.
Oxygène (dissous dans l'eau), 919.
Ozène (Bacille de l'), 650.
Ozonisation des eaux, 930.

P

Paille (Infusion de), 98.
Paludisme, 790.
Papier (Enrobement dans du), 92.
Paraffine, 284.
Paraffine (Lutage à la), 294.
Parvulus (Staphylococcus), 762.
Passages, 403.
Pasteur (Four), 7.
Pasteur (Liquides), 96, 987, 988.

Pasteur (Matras), 87.
Pasteur (Pipette), 80, 89, 155, 190.
Pasteur (Tube double de), 191.
Pasteur (Tube simple de), 192
Pasteurellæ (Immunisation contre les), 446.
Pasteurellose, 799.
Pasteurellose aviaire, 801.
— bovine, 805.
— canine, 805.
— caprine, 807.
— équine, 804.
— ovine, 806.
— porcine, 808.
— des lapins, 208.
— des oiseaux, 215.
Penicillium brevicaule, 357.
Peptone (Solution de), 105.
Peptones, 102.
Peptonisants (Microbes p. du lait), 981.
Péré (Liquide de), 989.
Péré (Procédé de), 915.
Perfringens (Bacillus), 756.
Péripneumonie, 846.
Peste (Bacille de la), 689.
Peste bovine, 865.
Peste bovine (Immunisation contre la), 472.
Pesteux (Poison), 390.
Petit lait, 111.
Pétri (Boîtes de), 89.
Pfeiffer (Bacille de), 715, 1003.
Pfeiffer (Appareil de), 298.
Pfeiffer (Gélose de), 132.
Pfeiffer (Phénomène de), 475.
Phagocytes, 412.
Phagocytose, 439.
Philocytase, 476, 482.
Phosphorescence, 365.
Pièces pathologiques (Prélèvement des), 268.
Pied de Madura, 765.
Pigeons (Septicémie des), 215.
Pigment verdâtre non fluorescent, 364.
Pigment vert fluorescent, 363.
Pinces pour animaux, 237.
Piorkowski (Gélatine de), 126.
Pipette Pasteur, 80, 89, 155, 190.
Piqûre (Ensemencement par), 159.
Piroplasma bigeminum, 890.
— canis, 894.
— equi, 895.
— ovis, 895.
— Kollei, 894.
Piroplasmoses, 890.
Pisciaire (Tuberculose), 532.
Pityriasis versicolor, 787.
Placenta (Manière de recueillir le sang du), 147.
Plaques de gélatine (Procédé des), 170.
Plaques de Koch, 90.
Platines chauffantes, 296.
Platine chauffante de Ranvier, 297.
— de Vignal, 297.
Pleurétique (Manière de recueillir la sérosité), 145.
Pneumobacille de Friedländer, 646.
Pneumocoque (Affections dues au), 638.
Pneumocoque (Immunisation contre le), 453.
Pneumococcique (Poison), 391.
Pneumo-entérite du mouton, 806.
Pneumo-entérite du porc, 810.
Pneumonie des chèvres, 807.
Pneumonie des cobayes, 211-212.
Pneumonie du porc, 808.
Poison botulique, 382.

Poison du bacille de Pfeiffer, 391.
— du bacillus Chauvœi, 386.
— charbonneux, 390.
— du choléra des poules, 391.
— cholérique, 388.
— diphtérique, 387.
— pesteux, 390.
— pneumococcique, 391.
— pyocyanique, 389.
— streptococcique, 391.
— tétanique, 383.
— typhique, 389.
— du vibrion septique, 385.
Poisons du corps des microbes, 394.
Poisson (Bouillon de), 105.
Polychromatique (Bleu), 306.
Polynucléaires, 413.
Polynucléose, 429.
Pommes de terre (Analyse des), 971.
Pommes de terre (Bouillon de), 97.
Pommes de terre (milieu nutritif), 134.
Pompe à mercure, 13, 186.
Porc (Charbon symptomatique du), 825.
Porc (Rouget du), 812.
Porcine (Pasteurellose), 808.
Post mortem (Migrations), 270.
Pottien (Bacille de), 676.
Poudre Arloing, 408.
Poules (Choléra des), 215.
Poules (Septicémie des), 214.
Pourriture d'hôpital, 735.
Poussières (Analyse des), 944.
Preisz-Nocard (Bacille de), 835.
Prélèvement des échantillons d'eau, 906.
Prélèvement des produits pathologiques, 263.
Prélèvement des pièces provenant d'opérations, 268.
Pression (Filtration par), 73.
Présure, 350.
Procédé Bassenge, 931.
Procédé Bordas et Girard, 931.
— Debrand, 197.
— Kühne, 319.
— Mérieux, 315.
— Roux et Yersin, 172.
— Veillon, 173, 177, 201.
— Vignal, 198.
Produits bucco-pharyngés (Prélèvement des), 267.
Produits pathologiques (Prélèvement des), 263.
Propriétés agglutinantes, 478.
Proskauer et Beck (Liquides), 990.
Proskauer et Capaldi (Liquides),
Protéases, 350.
Protéoses, 114.
Protéosoma, 887.
Protozoaires (Coloration des), 336.
Protozoaires (Coloration des noyaux des), 337.
Protozoaires (recherche dans les tissus), 998.
Provisions de bouillon, 107.
Pseudo-bacille de l'influenza, 720.
Pseudo-bacille tuberculeux, 548.
Pseudo-butyrique de Hüppe (Bacille), 982.
Pseudo-diphtérique (Bacille), 629.
Pseudo-éosinophiles (Granulations), 416.
Pseudo-farcins, 835.
Pseudo-tuberculeux (Bacilles p. t. dans le beurre), 982.
Pseudo-tuberculeux (Bacilles p. t. dans le lait), 980.

Pseudo-tuberculoses, 554.
Pseudo-tuberculose aspergillaire, 575.
Pseudo-tuberculose du cobaye, 212,
Pseudo-tuberculose coccobacillaire, 555.
Pseudo-tuberculose du lapin, 209.
Psittacose, 215, 560.
Pulmonaire (Prélèvement du suc), 268.
Purification des eaux, 925.
Pus (Prélèvement du), 266.
Pyocyanine, 363.
Pyocyanique (Bacille), 671.
— (Poison), 389.
— (Variété mélanogène du), 999.

Q

Qualitative (Analyse q. des eaux), 912.
Quantitative (Analyse q. des eaux), 909.

R

Radiiformis (Bacillus), 761.
Rage, 590.
Rainures (Boîte à), 89.
Raisin (Gélatine au), 124.
Ramosus (Bacillus), 758.
Ranvier (Chambre humide de), 294.
Ranvier (Platine chauffante de), 297.
Raulin (Liquide de), 96.
Rats (Maladies des), 213.
Rats (Trypanosome des), 213.
Réaction (Changements de), 355.
Réceptivité (Degré de r. des animaux), 230.
Rectales (Inoculations), 254.
Réduction (Phénomènes de), 356.
Réglage des étuves, 162.
Régulateur Chancel, 163.
Régulateur d'Arsonval, 164.
Régulateur Giroud, 4.
Régulateur Moitessier, 4.
Régulateur de Roux, 165.
Rein (Inoculations dans le), 250.
Remy (Gélatine de), 127.
Remy (Méthode de), 604, 917.
Reniformis (Diplococcus), 763.
Repiquage, 178.
Résistance des animaux, 256.
Rinderseuche, 805.
Rivière (Streptothrix de), 769.
Rhinosclérome (Bacille du), 650.
Rosenbach (Erysipéloïde de), 768.
Rouget du porc, 812.
Roux (Appareil à hydrogène de), 184.
Roux (Etuves de), 11-13.
Roux (Régulateur de), 165.
Roux (Tubes de R. pour cultures sur pommes de terre), 89.
Roux (Tubes de R. pour cultures anaérobies), 194, 195, 200, 201.
Roux et Yersin (Bleu composé de), 993.
Roux et Yersin (Procédé de), 173.

S

Saccharification, 345.
Saccharomyces de Curtis, 771.
Saccharomyces guttulatus, 995.
— lithogenes, 885.
— neoformans, 886.

Sacs de collodion, 399.
Sacs de roseau, 401.
Sahli (Bleu de), 992.
Sanarelli (Bacille de), 744.
Sang défibriné, 114.
Sang gélosé, 132.
Sang (milieu de culture), 113.
Sang (Prélèvement du), 263.
Sangsues (Extrait de), 115.
Scheurlen (Liquide), 990.
Schültze (Appareil de), 298.
Schütz (Streptocoque de), 830.
Selles (Prélèvement des), 267.
Semences (Conservation des), 160.
Sensibilité chimique des leucocytes, 425.
Sensibilité tactile des leucocytes, 425.
Séparation des germes, 170.
Septicémie des cobayes, 210.
— des lapins, 208, 803.
— des pigeons, 215.
— des poules et dindes, 214.
— des veaux, 827.
— vibrionienne, 216, 840.
Seringues, 25, 220.
Séro-diagnostic, 264.
— de la fièvre typhoïde, 605.
— de la tuberculose, 547.
Séro-pronostic de la fièvre typhoïde, 610.
Sérothérapie antidiphtéritique, 636.
Sérothérapie antipesteuse, 700.
— de la fièvre aphteuse, 859.
— de la fièvre typhoïde, 1002.
— de la péripneumonie, 855.
— de la peste bovine, 871.
Serpens (Bacillus), 761.
Sérum (Coagulation du), 149.
Sérum (Lysines du), 433.
Sérum (Milieux à base de), 138.
Sérum (Stérilisation du), 148.
Sérum anticharbonneux, 456.
— anticholérique, 449.
— anticolibacillaire, 452.
— antidiphtérique, 460, 636.
Sérums antimicrobiens, 475.
Sérum antipesteux, 454, 700.
— antipestique, 472, 871.
— antipneumococcique, 453.
— antipyocyanique, 448.
— antisepticémique, 457.
— antistreptococcique, 453.
— antitétanique, 470, 520.
Sérums antitoxiques, 479.
Sérum antityphique, 451, 1002.
Sérum contre le charbon symptomatique, 458.
Sérums cytotoxiques, 481.
Sérum glycériné, 152.
— hématotoxique, 490.
— hémonucléotoxique, 487.
— hémotoxique, 484.
— hépatotoxique, 494.
— leucotoxique, 488.
— néphrotoxique, 492.
— névrotoxique, 492.
— spermotoxique, 490.
— surrénotoxique, 493.
— trichotoxique, 493.
Singe (Hœmamœbose du), 890.
Singes (Maladies des), 218.
Smegma (Bacilles du), 549.
Soins à prendre après les inoculations, 260.
Sol (Analyse du), 951.
Solides (Milieux), 117, 134.

Solidifiés (Milieux liquides), 117.
Solution de Jaksch, 96.
Solution de Mayer, 96.
Solution de peptone, 105.
Solutions colorantes, 306.
Sous-cutanées (Inoculations), 242.
Spermotoxines, 490.
Spirilles (dans l'angine de Vincent), 741.
Spirille (d'Obermeier), 751.
Spirilles (dans la pourriture d'hôpital), 736.
Spirillose des oies, 216 t 841.
Spirillum nigrum, 762.
Splénique (Prélèvement du suc), 268.
Spores (Coloration des), 326.
Staphylococcus parvulus, 762.
Staphylocoques, 653.
Stérilisateur Büdenberg, 9.
Stérilisateur Wiessnegg, 9.
Stérilisation des eaux, 930.
Stérilisation par les antiseptiques, 78.
— par la chaleur humide, 57.
— par la chaleur sèche, 54.
— par le chauffage discontinu, 65.
— par filtration, 39.
Strauss (Méthode de S. pour la coloration des cils), 299.
Streptobacille de Ducrey, 712.
Streptococcique (Poison), 391.
Streptococcus tenuis, 666.
Streptocolysine, 1000.
Streptocoques (Affections animales à), 829.
Streptocoques (Affections humaines à), 659.
Streptocoque (Immunisation contre le), 453.
Streptocoque de l'anasarque du cheval, 832.
Streptocoque de Bonome, 724.
— du bouton d'Alep, 667.
— de la mammite des vaches, 829.
— de Méry, 667.
— de la paraplégie du cheval, 832.
— de la salive, 666.
— de Schütze, 830.
Streptothrix, 563-765.
Streptothrix de l'actinomycose, 563.
Streptothrix de l'actinomycose (coloration du), 334.
— aurea, 769.
— d'Eppinger, 768.
Streptothrix du farcin du bœuf, 843.
— de Rivière, 769.
— de Vincent, 765.
Sublimé (comme fixateur), 283.
Subtances bactéricides, 433.
Suc pulmonaire (Prélèvement du), 268.
Suc splénique (Prélèvement du), 268.
Sucrase, 352.
Sucres (Fermentation des), 346.
Surra, 905.
Surrenotoxines, 493.
Système Anderson, 929.
Système Clarke, 929.

T

Teignes des animaux, 882.
Teignes tondantes de l'homme, 778.

Température des animaux, 260.
Terni et Bandi (Vaccin de), 396.
Tétanique (Poison), 383.
Tétanos, 514.
Tétanos (Isolement du b. tétanique dans le sol), 954.
Tétragènes, 668.
Timothée-bacillus, 550.
Théorie de la filtration, 76.
Thétoïdes (Bacillus), 760.
Thoma Zeiss (Comptes-globules de), 419.
Tochtermann (Gélose de), 131.
Tokelau, 789.
Tondante de Grüby, 786.
Touraillons (Infusion de), 99.
Toxines solubles, 380.
Transport des échantillons d'eau, 908.
Transvasement des liquides stériles, 80.
Travail-bascule de Vinsot, 240.
Triacide (Solution t. d'Ehrlich), 415.
Trichomonas caviæ, 210.
Trichotoxines, 493.
Tricophytons, 781.
Tricophytons des animaux, 882.
Tricrésol, 226.
Triple coloration, 323.
Trompe à eau, 14, 188.
Trypanosomes (Affections à), 896.
Trypanosomes de l'homme, 1004.
Trypanosomes du lapin, 207.
Trypanosomes du rat, 213.
Tube de Buchner, 196.
Tube double de Pasteur, 191.
Tubes à essai, 86-89.
Tube de Fränkel, 199.
Tube de Gayon, 86.
Tube de Miquel, 83.
Tubes de Roux (pour anaérobies), 194, 195, 200, 201.
Tubes de Roux (pour pommes de terre), 89.
Tube simple de Pasteur, 192.
Tuberculeux (Bacilles t. dans le beurre), 982.
Tuberculeux (Bacilles t. dans le fromage), 984.
Tuberculeux (Bacilles t. dans le lait), 979.
Tuberculeux (Pseudo-bacilles), 548.
Tuberculine, 392.
Tuberculinisation, 545.
Tuberculose, 531.
Tyndall (Méthode de), 65.
Typhique (Bacille).
Typhique (Poison), 389.
Tyrothrix, 985.
Tyrothrix tenuis, 350.

U

Uréase, 351.
Urine, 116.
Urine (Prélèvement de l'), 267.
Urodiagnostic, 611.
Uschinsky (Liquide), 989.

V

Vaccin animal (Préparation du), 587.
Vaccin antirabique, 406.
Vaccin charbonneux, 405.
Vaccin du charbon symptomatique, 408.
Vaccin du choléra des poules, 404.
Vaccins d'Haffkine, 396.
Vaccin de Terni et Bandi, 396.
Vaccination anticholérique, 688.
— antityphique, 612.
— antipesteuse, 699.

Vaccination charbonneuse, 505.
— du barbone, 809.
— du charbon symptomatique, 822.
— du choléra des poules, 809.
— de la fièvre aphteuse, 860.
— de la péripneumonie, 853.
— de la peste bovine, 871.
— du rouget, 815.
Vaccine, 583.
Vaches (Mammite des), 829.
Vaillard et Besson (Étuve), 9.
Vapeur d'eau à 100 degrés (Stérilisation par la), 58.
Vapeur d'eau sous pression (Stérilisation par la), 61.
Variole, 588.
Vases de culture, 85.
Vases de culture (Soins à donner aux), 90.
Veaux (Diarrhée des), 826, 1006.
Veaux (Septicémie des), 827.
Végétales (Infusions), 97.
Veillon (Anaérobies de), 755.
Veillon (Procédé de), 173, 177, 201.
Veillon et Morax (Cocco-bacille de), 756.
Verdin (Gouttière de), 239.
Verruga, 552.
Verts fluorescents (bacilles), 676.
Viande (Macération de), 105.
Viandes (Analyse des), 963.
Vibrio Metchnikowii (Immunisation contre le), 451.
Vibrions cholériques, 678.
Vibrions cholériques (Immunisation contre les), 449.
Vibrion de Finkler-Prior, 688.
Vibrion septique, 507.
Vibrion septique (Immunisation contre le), 457.
Vibrion septique (isolement du sol), 954.
Vibrion septique (Poison du), 385.
Vibrions (recherche dans l'eau), 914.
Vibrionienne (Septicémie), 216, 840.
Vignal (Platine chauffante de), 297.
Vignal (Tube de), 198.
Vin (Analyse du), 933.
Vincent (Angine de), 739.
Vinsot (Travail-bascule de), 240.
Viridis (Bacillus), 677.
Virulence (Augmentation de la), 399.
Virulence (Conservation de la), 410.
Virulence (Diminution de la), 403.
Virus de la peste bovine, 472.
Viscosus lactis (Bacillus), 978.
Visqueuse (Fermentation), 977.
Voges (Boîte de), 237.
Weeks-Morax (Bacille de), 732.
Weichselbaûm (Méningocoque de), 722.
Weigert (Violet de), 992.
Weigert-Koch (Solution de), 992.
Wertheim (Gélose de), 132.
White-Scour, 1005.
Wiessnegg (Bain-marie de), 65.
Wiessnegg (Stérilisateur), 9.
Wildseuche, 805.
Würtz (Appareil de), 193.

Z

Ziehl-Neelsen (Fuchsine de), 993.
Zymase, 353.

CHARTRES. — IMPRIMERIE DURAND, RUE FULBERT.



